

**Molekulares Imaging (MALDI-IMS) humaner Kopf-Hals-
Tumore und funktionelle Analyse pathologisch
exprimierter Proteine am Beispiel von S100A8 und
Annexin A5**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)



vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät der
Friedrich-Schiller-Universität Jena

von
Diplom-Biologin Liane Wehder
geboren am 19.07.1983 in Räckelwitz

Gutachter:

1. Prof. Dr. Ferdinand von Eggeling
2. Prof. Dr. Stephan Diekmann
3. Prof. Dr. Dr. med. Jens K. Habermann

Tag der mündlichen Prüfung: 24.06.2013

Für meine Familie

Die vorliegende Arbeit wurde zwischen Juli 2008 und November 2012 am Institut für Humangenetik in der Arbeitsgruppe Core Unit Chip Application am Universitätsklinikum Jena angefertigt.

Wesentliche Teile der in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse sind in folgenden Publikationen bereits veröffentlicht:

Wehder L, Ernst G, Crecelius AC, Guntinas-Lichius O, Melle C, Schubert US, von Eggeling F.: Depicting the spatial distribution of proteins in human tumor tissue combining SELDI, MALDI imaging and Immunohistochemistry; J. Histochem Cytochem. 2010 Apr 15; 316 (7): 1234-40

Wehder L, Arndt S, Murzik U, Bosserhoff AK, Kob R, von Eggeling F, Melle C.: Annexin A5 is involved in migration and invasion of oral carcinoma; Cell Cycle. 2009 May 15; 8(10):1552-8. Epub 2009 May 13.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	1
Summary	3
1 Einleitung	5
1.1 Die Technik des MALDI-IMS	5
1.1.1 Vor- und Nachteile von MALDI-IMS	5
1.1.2 Anwendung von MALDI-IMS	7
1.2 Die Familie der kalziumbindenden S100-Proteine.....	8
1.2.1 Struktur der S100-Proteine	8
1.2.2 Biologische Funktion der S100-Proteine	9
1.3 Die kalziumbindenden Proteine S100A8 und S100A9	11
1.3.1 Spezifische Expression von S100A8 und S100A9	12
1.3.2 Biologische Funktion von S100A8/A9.....	12
1.3.3 Pathologie von S100A8 und S100A9	13
1.3.4 S100A8 und S100A9 sind Liganden für RAGE	13
1.4 Die Familie der Annexine	14
1.4.1 Molekulare Struktur der Annexine	15
1.4.2 Biologische Funktion der Annexine	16
1.5 Annexin A5	17
1.6 EMT fördert die Tumormetastasierung	18
2 Material	21
2.1 Arbeitsgeräte.....	21
2.2 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	23
3 Methoden	26
3.1 Massenspektrometrische Methoden.....	26
3.1.1 Probenpräparation	26
3.1.2 MALDI-IMS.....	26
3.1.3 Mikrodisektion und SELDI-TOF-MS.....	26
3.1.4 Immundepletion/ Immuncapturing	27
3.2 Arbeiten mit eukaryotischen Zellen	28
3.2.1 Verwendete Zelllinien	28
3.2.2 Zellkultur eukaryotischer Zellen	28
3.2.3 Bestimmung der Zellzahl mittels Trypanblau.....	28
3.2.4 Bestimmung der Zellzahl mittels CASY.....	29
3.2.5 Stimulation der S100A8-Expression	29
3.3 Arbeiten mit Proteinen	29
3.3.1 Herstellung von Zelllysaten	29
3.3.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	29
3.3.3 Western Blot.....	31
3.3.4 Immunpräzipitation mittels IDM Affinity Beads.....	32

3.3.5	Co-Immunpräzipitation mittels Protein-A-Agarose.....	32
3.3.6	Immunhistochemie.....	33
3.4	Zellbiologische Arbeiten.....	34
3.4.1	Transfektion von siRNA	34
3.4.2	Indirekte Immunfluoreszenz	34
3.4.3	Invasions- und Migrationsassays mittels Boyden-Kammer.....	35
3.4.4	Scratch-Assay.....	35
3.4.5	Colony Forming Assay	35
3.5	Arbeiten mit DNA und RNA.....	36
3.5.1	Plasmid-Transformation in kompetente Zellen.....	36
3.5.2	Minipräparation des DNA-Plasmids	36
3.5.3	Midipräparation des DNA-Plasmids	36
3.5.4	DNA-Gelelektrophorese	37
3.5.5	Transfektion von Plasmid-DNA in eukaryotische Zellen	37
3.5.6	RNA-Isolation.....	37
3.5.7	cDNA-Synthese	37
3.5.8	Quantitative PCR	38
3.5.9	Genexpressions-Analyse.....	38
3.5.10	DNA-Microarray	39
4	Ergebnisse	41
4.1	MALDI-IMS-Analyse von Kopf-Hals-Tumoren	41
4.1.1	Etablierung der MALDI-IMS-Technik	41
4.1.2	Messung verschiedener Kopf-Hals-Tumor-Proben	44
4.1.3	Etablierung einer Kombination aus MALDI-IMS, SELDI-MS und Immunhistochemie	47
4.1.4	Identifizierung von S100A8 mittels Immundepletion und Immuncapturing	51
4.1.5	Verteilung verschiedener S100-Proteine innerhalb der Kopf-Hals-Tumore	52
4.1.6	Segmentierung von MALDI-IMS-Datensätzen.....	54
4.1.7	MALDI-IMS von humanen Zellen.....	58
4.2	Funktionelle Charakterisierung von S100A8.....	58
4.2.1	S100A8-exprimierende Zelllinien	59
4.2.2	S100A8-Plasmid-Transformation und Transfektion	59
4.2.3	Stimulation der Expression und Sekretion von S100A8/A9 mit CaCl ₂	60
4.2.4	Lokalisation von S100A8 innerhalb der Zelle	61
4.2.5	Beteiligung von S100A8 an Invasions- und Migrationsprozessen.....	63
4.2.6	Colony Forming Assay	66
4.2.7	Untersuchung des Einflusses von S100A8 auf Metastase-involvierter Gene	67
4.3	Funktionelle Charakterisierung von Annexin A5	72
4.3.1	Annexin A5 beeinflusst das Migrationspotential eines Oralkarzinoms.....	73
5	Diskussion	79
5.1	Etablierung der MALDI-IMS-Technik.....	79
5.2	Darstellung der räumlichen Verteilung von Proteinen	80
5.3	Verteilung der S100-Proteine innerhalb der Kopf-Hals-Tumore	84
5.4	Segmentierung der MALDI-IMS-Datensätze.....	86
5.5	MALDI-IMS von humanen Zellen	87

5.6	Funktionelle Charakterisierung von S100A8.....	88
5.6.1	Expression von S100A8 innerhalb der Kopf-Hals-Tumore	89
5.6.2	Die Rolle von S100A8/S100A9 bei Migrations- und Invasionsprozessen.....	89
5.7	Annexin A5 beeinflusst das Migrationsverhalten eines Oralkarzinoms	94
5.7.1	Annexin A5 beeinflusst die Expression von Metastase-involvierten Genen.....	95
5.8	Ausblick	97
6	Verzeichnisse	98
6.1	Literaturverzeichnis.....	98
6.2	Abbildungsverzeichnis.....	119
6.3	Tabellenverzeichnis.....	120
6.4	Abkürzungsverzeichnis.....	121
	Veröffentlichungen	123
	Lebenslauf	124
	Eigenständigkeitserklärung	125
	Danksagung	126

Zusammenfassung

Mit Hilfe der *Matrix assisted laser desorption/ionization* (MALDI) *imaging mass spectrometry* (IMS) ist es möglich, das molekulare Profil eines Gewebes direkt auf der Probe zu erstellen. Dabei kann die Verteilung von hunderten unbekannten Analyten im Gewebe mit einer einzigen Messung bestimmt werden, während die molekulare und zelluläre Integrität innerhalb des Gewebes aufrechterhalten wird. In den letzten Jahren hat diese Methode immer größeren Zuspruch gefunden und wird heute vor allem in der biomedizinischen Forschung genutzt. In der vorliegenden Promotion wurde MALDI-IMS etabliert und an humanen Tumorgewebeproben angewandt. Dabei wurden verschiedene Kopf-Hals-Tumor-Proben analysiert und ausgewertet. Es konnte eine neue Kombination aus MALDI-IMS, SELDI-MS und Immunhistochemie für die Darstellung der räumlichen Verteilung von Proteinen innerhalb der Gewebeproben entwickelt und etabliert werden. 4 Proteine (α -Defensin 1-3 und S100A8) wurden dabei identifiziert und die exakte Lokalisation im Gewebe aufgezeigt. So konnten mittels MALDI-IMS die Signale bei 3372 Da, 3444 Da und 3488 Da sowohl im Tumorstroma als auch im Bindegewebe und im nekrotischen Gewebe detektiert werden. Der Peak bei 10827 Da hingegen wurde nur im Tumorgewebe, vor allem an der Peripherie des epithelialen Tumors, sowie an der Grenze zum Stroma detektiert. Eine Bestätigung dieser Ergebnisse war mit Mikrodissektion und SELDI-MS sowie mit Immunhistochemie erfolgreich. Weiterhin konnte das Signal von 10827 Da mit Immundepletion und Immuncapturing als humanes S100A8 identifiziert werden. Mit MALDI-IMS wurde auch die Verteilung anderer Mitglieder der S100-Proteinfamilie innerhalb der Kopf-Hals-Tumore untersucht. Die Mitglieder der Ca^{2+} -bindenden S100-Proteinfamilie sind multifunktionale Proteine, für die eine Vielzahl von physiologischen Funktionen beschrieben wurden. Es konnte gezeigt werden, dass die detektierten S100-Proteine eine annähernd gleiche Lokalisation im Gewebe aufzeigen. Dies lässt vermuten, dass die S100-Proteine eine Rolle während der Tumorgenese von Kopf-Hals-Tumoren spielen.

Aufgrund der Detektion von S100A8 am Tumorrand der Kopf-Hals-Tumore wurde angenommen, dass das Protein bei Tumorprogressions- und -invasionsprozessen eine Rolle spielt und sollte im Rahmen dieser Promotion näher beleuchtet werden. S100A8 kann als Homodimer in der Zelle vorliegen, bildet aber bevorzugt ein funktionelles, antiparalleles Heterodimer mit S100A9. Aus diesem Grund wurde die Funktion des S100A8/A9-Heterodimers untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl humane HaCaT-Keratinocyten als auch FaDu-Karzinomzellen des Kopf-Hals-Bereiches eine erhöhte Migrationsaktivität und ein erhöhtes Invasionspotential besitzen, wenn S100A8/A9 überexprimiert vorliegt. Desweiteren konnte in einem Wundheilungsassay, einem sogenannten „Scratch-Assay“ beobachtet werden, dass das Schließen einer in den konfluenten Zellrasen gekratzten Wunde durch S100A8/A9 gefördert wird. Um den Einfluss von S100A8/A9 auf die Tumorprogression zu analysieren, wurden die Expressionsprofile von Metastase-involvierten Genen mit Hilfe des 44 K Microarrays von Agilent erstellt. Dabei konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression des Heterodimers S100A8/A9 eine Signalkaskade auslöst, die die Tumorzellen zur Proliferation und Metastasierung anregen. Zell-Zell-Adhäsionsproteine werden herunterreguliert und Gene, die zum Zellwachstum und zur Zellproliferation beitragen, werden vermehrt exprimiert. Somit kann angenommen werden, dass der Komplex aus S100A8 und S100A9 eine entscheidende Rolle bei der Tumorprogression und Metastasierung spielt.

Ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Tumorprogression spielt das Protein Annexin A5, welches in früheren Studien unserer Arbeitsgruppe mittels ProteinChip Technologie am Tumorrand von Kopf-

Hals-Tumoren lokalisiert wurde. Das Protein lag dort signifikant hochreguliert vor. Auch Annexin A5 ist ein kalziumbindendes Protein. Es gehört zur Klasse der sehr weit verbreiteten Kalzium- und Phospholipid-bindenden Proteine, deren physiologische Funktionen weitgehend unbekannt sind. Im Rahmen dieser Promotion konnte gezeigt werden, dass sowohl humane HaCaT-Keratinocyten als auch Zellen einer Primärkultur eines Oralkarzinoms (PE15) eine verringerte Migrationsaktivität und ein verringertes Invasionspotential zeigen, wenn Annexin A5 mittels RNA-Interferenz herunterreguliert wurde. Um die mögliche Rolle von Annexin A5 bei Metastasierungsprozessen aufzuklären, wurde die Wirkung der Depletion von Annexin A5 auf andere metastasierungsrelevante Gene mittels DNA-Microarrays untersucht. In HaCaT-Zellen, die eine verminderte Migrations- und Invasionsaktivität aufgrund der siRNA-induzierten Annexin A5-Depletion aufweisen, zeigen einige Gene eine Annexin A5-regulierte Expression. Diese veränderte Genexpression korreliert mit der biologischen Funktion der Genprodukte hinsichtlich Proliferations- und Invasionsprozessen.

So konnten im Rahmen dieser Arbeit zwei kalziumbindende Proteine detektiert und charakterisiert werden, denen eine mögliche Funktion während der Tumorprogression und Metastasierung zugeschrieben werden kann. Weiterhin war es möglich eine MS-basierte Technik zur Erstellung des Proteinprofils eines Gewebeschnittes zu etablieren. Die Technik bietet einen detaillierten Einblick in die komplexe Zusammensetzung von Geweben unter Berücksichtigung des morphologischen und histologischen Hintergrunds und ist damit eine zukunftsorientierte Technik zur Detektion neuer Biomarker.

Summary

Matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI) imaging mass spectrometry (IMS) is a newly developed technique that generates molecular profiles of proteins directly from thin tissue sections. Therefore, IMS could be used to determine the distribution of hundreds of unknown compounds with a single measurement while maintaining the cellular and molecular integrity within the tissue. In the last years this technique gets more and more reception and today it is used mainly in the biomedical research. In the present study the application of MALDI-IMS to human tumor tissue could be successfully established. Therefore different head and neck tumor tissues were analysed. I could develop a new combination of MALDI-IMS, SELDI-MS and immunohistochemistry to depict the spatial distribution of proteins in human tumor tissue. 4 proteins (HNP1-3 and S100A8) could be identified and exactly localized within the tissue. Amongst others, characteristic peaks of 3372 Da, 3444 Da and 3488 Da showed a high expression in the stroma parts of the tumour tissue, as well as in connective tissue and necrotic tissue parts. A peak at 10827 Da displayed a varying dissemination predominantly in the periphery of epithelial tumor areas next to stroma parts. These results were confirmed with a combination of micodissection and SELDI-MS analysis and with immunohistochemistry. Furthermore the signal at 10827 Da could be identified as human S100A8 with immunodepletion and immunocapturing. Using MALDI-IMS I also investigated the distribution of other S100-protein-family members. S100 proteins are small multifunctional, calcium-regulated proteins of the EFhand type and are involved in the regulation of several intracellular and extracellular processes. I observed that the S100-proteins have the identical localization within the tissue. This indicates a biological function in the tumorigenesis of head and neck tumors.

S100A8 suggests a contribution to tumorprogression and invasion due to predominantly detection in the periphery of epithelial tumor tissue. S100A8 exists as homodimer within the cells, but it preferently forms a functional antiparallel heterodimer with S100A9. Thus, I investigated the function of the heterodimer S100A8/A9. Both HaCaT-keratinocytes and FaDu-cells showed an increased migration and invasion capacity after an S100A8/A9 overexpression. Furthermore I could show that wound healing is promoted by S100A8/A9. HaCaT and FaDu cells transiently transfected with S100A8/A9 were able to quickly close a wound applied by scratch assay. To assess whether S100A8/A9 regulate metastasis functions, I performed a genomic analysis of several genes linked to human metastasis by 44 K microarray (Agilent). Here I could show that an overexpression of S100A8/A9 results in an activation of a signal- cascade for tumorproliferation and metastatic processes. Genes, coding for cell-cell-adhesion were downregulated and genes, regulating cell growth and cell proliferation were overexpressed. These observations indicate a crucial role of S100A8/A9 in tumorproliferation and metastatic processes.

Annexin A5 plays also a crucial role in tumorprogression and in recent studies we detected an upregulated expression in the invasive front of head and neck tumors by a proteomic approach. This protein belongs to the annexins which form a family of peripheral membrane proteins that can bind calcium and negatively charged phospholipids. The physiological function of this protein is up to now unknown. Thus I wanted to further elucidate the detected functions of Annexin A5 in the regulation of proliferation and invasion. I could detect both, a decreased migration activity and a decreased invasion capability of human keratinocytes and of cells from primary culture of an oral carcinoma (PE15) lacking Annexin A5 by RNA interference. To assess whether Annexin A5 mediates metastatic processes I performed a genomic analysis of several genes linked to human metastasis by a

microarray. Hereby I found a number of genes which showed altered mRNA expression upon knockdown of Annexin A5. In HaCaT cells possessing reduced migration and invasion activity caused by downregulation of Annexin A5 due to RNA interference some of the analyzed genes showed modulated expression. This reflects well the biological function of the corresponding gene products on proliferation and invasion processes.

In the present study I could detect and characterize two Ca^{2+} -binding proteins, which affected the invasion capacity of human carcinoma cells. Furthermore I established a MS-based technique to generate molecular profiles of proteins directly from thin tissue sections. The MALDI-IMS technique is a promising method for the detection of new biomarkers and will provide a more detailed insight into complex cellular backgrounds taking into consideration the histology.

1 Einleitung

1.1 Die Technik des MALDI-IMS

Matrix assisted laser desorption/ionization (MALDI) *imaging mass spectrometry* (IMS) ist eine Methode, mit der das molekulare Profil eines Gewebes direkt auf der Probe erstellt werden kann. Dabei wird der morphologische Zusammenhang innerhalb der Probe berücksichtigt [Chaurand et al. 2004]. Somit ist es möglich die Verteilung von hunderten unbekannten Analyten, wie Proteinen, Peptiden, Lipiden oder kleinen Molekülen (z.B. Pharmazeutika) mit einer einzigen Messung zu bestimmen, während die molekulare und zelluläre Integrität innerhalb des Gewebes aufrechterhalten wird. Einzelne Massenspektren werden über den gesamten Schnitt erstellt. Jedes molekulare Signal wird über Falschfarben entsprechend der Konzentration des Analyten dargestellt. Kombinierte Signale können verschiedene funktionelle Regionen innerhalb des Gewebes charakterisieren. In den letzten Jahren hat diese Methode immer mehr Zuspruch gefunden. So wird sie heute vor allem in der biomedizinischen Forschung genutzt.

Die ersten IMS-Methoden wurden vor über 40 Jahren entwickelt [Liebl 1967]. Die bisher entwickelten Methoden unterscheiden sich in der Art der Ionisierung, der Basis der massenspektrometrischen Analyse. Derzeit gibt es drei etablierte Ionisierungsarten, die bei IMS-Verfahren genutzt werden: *secondary ion mass spectrometry* (SIMS) [Liebl 1967], *matrix assisted laser desorption/ionization* (MALDI) [Karas et al. 1988] und *desorption electrospray ionization* (DESI) [Takats et al. 2004, Wiseman et al. 2006]. Zusätzlich zu diesen drei Methoden wurden in den letzten Jahren viele neue Arten der Ionisierung entwickelt [Lewis WG 2003, Sampson et al. 2006, Northen et al. 2007, Nemes et al. 2010], doch derzeit wird keine dieser Arten angewandt, da es keine kommerziell erhältlichen Instrumente gibt. Jede dieser Methoden hat seine individuellen Vor- und Nachteile, welche die räumliche Auflösung, den Massenbereich oder die Möglichkeit spezielle Proben zu messen, betreffen [Balluff et al. 2011].

1.1.1 Vor- und Nachteile von MALDI-IMS

Wie der Name MALDI schon sagt, werden die Proben mit einer kristallinen Matrix beschichtet, bevor die massenspektrometrische Messung erfolgt. Die Matrix absorbiert die Energie des bestrahlenden Lasers, was zu einer Ionisierung der Analyten führt. Der exakte Mechanismus dieser sogenannten „soften Ionisierung“ ist nicht vollständig aufgeklärt und wird noch immer intensiv erforscht. Die Bildung von größeren Ionen, wie bei Peptiden und Proteinen wird mit dieser Ionisierung im Gegensatz zu SIMS oder DESI, ermöglicht [Karas et al. 2003, Knochenmuss 2003 2006, Chang et al. 2007, R. 2009]. Welche Moleküle im massenspektrometrischen Experiment beobachtet werden, hängt nicht nur von der Ionisierung ab. Matrix und Probenvorbereitung spielen dabei auch eine Rolle [Balluff et al. 2011].

Das gesteigerte Interesse an MALDI-IMS führt zum Fortschritt in der technischen Entwicklung der letzten Jahre. So wurden die Laserfrequenz, die räumliche Auflösung, die Sensitivität für höhere Massen, die Massenauflösung und die Massengenauigkeit verbessert. Einige Limitierungen wie Massenbereich und räumliche Auflösung sind entscheidend mit der Probenvorbereitung verbunden. Entwicklungen darin wurden bezüglich der Waschprotokolle, der Wahl der Matrix und der Methode der Matrixapplikation gemacht. In den letzten Jahren wurden auch Fortschritte in der MALDI-IMS-

Analyse von Formalin-fixierten, Paraffin-eingebetteten (FFPE) Geweben erzielt, so dass die Anzahl und Qualität der klinischen Proben erhöht werden konnte [Seeley et al. 2011].

Die Instrumentierung spielt eine wichtige Rolle für die Qualität der Ergebnisse der MALDI-IMS-Messung. Die genutzte Technik entscheidet über die Limitierung vieler wichtiger Faktoren, wie räumliche Auflösung, Messzeiten oder Massenbereiche und –auflösung. In den letzten Jahren wurden viele Fortschritte in allen technischen Aspekten beim MALDI-IMS erzielt, die Methoden und deren mögliche Anwendungen wurden verbessert. Eine gegenwärtige Limitierung von MALDI-IMS ist die räumliche Auflösung der Messungen, welche momentan bei 50 μm liegt. Die Auflösung wird durch die Matrix-Applikation begrenzt. Die Matrixkristalle auf dem Gewebe haben eine Größe von 100 nm bis einige μm , abhängig von der gewählten Applikations-Methode [Jaskolla et al. 2009]. Zusätzlich muss der Laser-Fokus beachtet werden. Während die Größe des Laserstrahls leicht verkleinert werden kann, führt eine Reduktion der bestrahlten Fläche zu einer kleineren Ionenausbeute. Das Ziel ist die Verbesserung der Auflösung zu einem Maß, in dem die MALDI-IMS-Messungen vergleichbar mit der Information sind, die man aus einer klassischen histomorphologischen Untersuchung aus optischer Mikroskopie bekommt, ohne die Signalqualität zu verlieren. Dafür ist es notwendig eine Auflösung bis auf Einzelzell-Niveau (10 μm) zu bekommen [Jurchen et al. 2005, Monroe et al. 2006, Li et al. 2007, Zimmerman et al. 2008, Zimmerman et al. 2010, Tucker et al. 2011].

Ein Anstieg in der räumlichen Auflösung führt auch zu einem exponentiellen Anstieg in der Messzeit, da mehr Einzelmessungen auf einer Gewebeprobe durchgeführt werden. Um die Messzeiten in einem akzeptablen Rahmen zu halten, müssen neue Wege gefunden werden, den Datendurchlauf zu erhöhen. So wurde ein Laser mit einer erhöhten Frequenz entwickelt, der die Messzeiten um bis zu 90 % herabsenkt [Trim et al. 2010].

Ein weiteres Problem beim MALDI-IMS ist die Massenauflösung. Momentan werden kleine Proteine und Proteinfragmente sehr gut aufgelöst. Liegt das Molekulargewicht des Analyten jedoch unter 500 Da, gehen die Daten im Hintergrundrauschen verloren [Watrous et al. 2011], während Massen über 25 kDa schwer zu detektieren sind [Balluff et al. 2011]. Da diese Limitierung eine Vielzahl von Proteinen ausschließt, werden große Bemühungen angestellt, den Massenbereich zu erweitern.

Ein wichtiger Schritt der MALDI-IMS-Messung ist die Wahl und Applikation der Matrix. Diese sollte eine lichtabsorbierende organische Säure mit einem geringen Molekulargewicht sein, die chemisch nicht mit dem Analyten reagiert. Außerdem sollte sie eine geringe Sublimationsrate haben, da die meisten MALDI-IMS-Messungen in einem hohen oder gar ultrahohen Vakuum stattfinden. Die Wahl der Matrix hängt außerdem von den zu untersuchenden Analyten ab, da sich jede Matrix unterschiedlich für die Ionisierung verschiedener Molekülklassen (wie Lipiden, Peptiden oder kleinen Proteinen) eignet [Amstalden van Hove et al. 2010]. Das Auftragen der Matrix sollte homogen und reproduzierbar sein. Durch die Homogenität wird garantiert, dass lokale Schwankungen im Auftragen und der Ionisierung auf ein Minimum reduziert werden, während die Reproduzierbarkeit den Vergleich einzelner Messungen ermöglicht [Amstalden van Hove et al. 2010]. Desweiteren ist es wichtig, dass die aufgetragene Matrix weder zu trocken noch zu nass ist. Letztendlich entscheidet die Größe der Matrixkristalle über die laterale Auflösung [Kaletas et al. 2009]. Das Auftragen kann entweder manuell oder automatisch erfolgen. Manuelle Methoden sind schnell, haben jedoch eine geringe Reproduzierbarkeit [Schwartz et al. 2003]. Eine automatische Matrixapplikation ermöglicht eine hohe Reproduzierbarkeit. Dafür gibt es zwei Methoden: entweder wird die Matrix über

chemisches InkJet printing aufgetragen [Adams RL 1986, Nakanishi et al. 2005, Delaney et al. 2011] oder automatisch aufgesprüht. Diese Matrixvernebelung erlaubt die Kontrolle der Tropfengröße und der Trockenperiode zwischen den Sprayzyklen, so dass die Größe der Matrixkristalle optimiert und leicht reproduziert werden kann [Crecelius et al. 2005, Balluff et al. 2011].

Ein großer Vorteil des MALDI-IMS ist, dass das Gewebe während der Messung nicht zerstört wird. Es wurde ein Protokoll entwickelt, welches die Färbung der Gewebeprobe nach der MALDI-IMS-Messung ermöglicht. Dabei wird die Matrix durch Waschen in einer Alkohollösung gelöst und anschließend das Gewebe mit Hämatoxylin/Eosin (HE) gefärbt [Schwamborn et al. 2007, Deutschens et al. 2011]. Diese Färbung ermöglicht eine perfekte Korrelation des HE-Bildes mit dem massenspektrometrischen Bild, was ein großer Vorteil zu den vorher genutzten Methoden ist, bei denen ein Folgeschnitt oder der Gewebeschnitt vor der Messung gefärbt wurde und somit die Qualität des Massenspektrums verloren ging [Chaurand et al. 2004].

Während einer MALDI-IMS-Messung erhält man hunderte Signale mit dem Molekulargewicht der Analyten, ohne dessen Identifizierung. Diese erfordert einen weiteren Schritt der MALDI-IMS Studien. Die Möglichkeit ein Protein von Interesse zu identifizieren hängt hauptsächlich von den chemischen Eigenschaften ab, aber auch von deren Masse und dem Zugang im Gewebe für die in situ Identifizierung [Balluff et al. 2011]. Bis heute existiert kein standardisiertes universell akzeptiertes Protokoll für die Identifizierung der Proteine [Balluff et al. 2011].

Ein Schlüsselschritt des gesamten MALDI-IMS-Prozesses ist die rechnerische und statistische Auswertung der Daten. Ein Datensatz einer MALDI-IMS-Messung besteht aus tausenden von räumlich aufgelösten Massenspektren, jedes davon besteht aus hunderten oder tausenden Massensignalen [McDonnell et al. 2010]. Mit der raschen Entwicklung der Instrumente mit Blick auf die räumliche Auflösung, der höheren Laserfrequenz und der Verbesserung in der Massenauflösung, sind die Menge der Daten angestiegen, was die Auswertung zeitaufwendig und kompliziert macht.

Obwohl die Methode des MALDI-IMS noch viele Defizite aufweist, stellt sie doch einen Meilenstein in der massenspektrometrischen Forschung dar und findet in vielen Gebieten Anwendung.

1.1.2 Anwendung von MALDI-IMS

Die Verfügbarkeit der Gewebeprobe nach der Messung hat MALDI-IMS in den letzten Jahren zu einem erfolgreichen Tool für die Analyse des molekularen Zusammenhalts von Gewebeschnitten, vor allem in der Tumorproteomik gemacht. Durch MALDI-IMS erstellte Protein-Profile wurden für die molekulare Klassifizierung der Gewebeprobe hinsichtlich Krankheitsstadium, Risikoabschätzung und Therapie-Anspruch genutzt. Auch für die Identifizierung von Krankheitsspezifischen Biomarkern wird diese Technik angewendet. In den letzten Jahren wurde eine Vielzahl von klinischen und vorklinischen Studien durchgeführt. So wurden beispielsweise Hirn-, Brust-, Lungen-, Ovarial-, Prostata- und Gastrointestinaltumore in klinischen Studien untersucht [McDonnell et al. 2010]. Außerdem gab es Untersuchungen zur Unterscheidung von gesunden und Tumorgewebe, verschiedenen Tumorstadien und Tumor-Subtypen mit dem Ziel Biomarker für eine bessere Diagnostik zu finden [Cazares et al. 2009, Balluff et al. 2010, El Aayed et al. 2010, Franck et al. 2010, Kim et al. 2010, Rauser et al. 2010, Schwamborn et al. 2010].

In der pharmazeutischen Forschung und Entwicklung ist die Prüfung der Verteilung von Medikamenten im Zielgewebe von großem Interesse für die Evaluierung der pharmakologischen

Eigenschaften [Signor et al. 2007]. Anfängliche Studien mit MALDI-IMS haben gezeigt, dass es nicht nur möglich ist, die Verteilung der Medikamente selbst innerhalb des Gewebes zu beobachten, sondern auch die simultane Ausbreitung der individuellen Metabolite [Khatib-Shahidi et al. 2006, Stoeckli M 2007, Schwamborn et al. 2010]. Aus diesem Grund hat diese Technologie eine enorme Beachtung in der akademischen Forschung und auch in pharmazeutischen Laboren gefunden [Prideaux et al. 2010].

Ein neues Gebiet wissenschaftlicher Studien ist die Lipidomik [Wolf et al. 2008]. Es beschäftigt sich mit der Verteilung von Lipiden, deren biologischer Rolle (z. B. als Signalmolekül, Neurotransmitter oder Precursor für second messenger) und den Einfluss auf zelluläre Funktionen (z. B. Apoptose, Proliferation und Inflammation). Mit MALDI-IMS ist es möglich, Aussagen über den Zusammenhang von Lipidfunktion und Gewebehistologie zu treffen [Pol et al. 2010, Pol et al. 2011]. Es gibt bereits Untersuchungen über die bildliche Darstellung von Lipiden, um die Visualisierung und Identifizierung von Phospholipiden [Shrivastava et al. 2010, Shanta et al. 2011] und anderen Fettsäuren [Hayasaka et al. 2010] zu verbessern. Jedoch gibt es kaum klinisch relevante Studien [Shimma et al. 2007]. Es wurde gezeigt, dass Lipidprofile Tumore verschiedenen Grades separieren können [Willems et al. 2010]. Bis heute hat MALDI-IMS das Gebiet der Lipidomik nur gestreift, aber Studienansätze lassen die Funktion von Lipiden in der Tumorbilogie vermuten [Fernandez et al. 2011].

Doch MALDI-IMS wird nicht nur für die molekularbiologische Histologie von Geweben genutzt. Auch Bakterienfilme [Yang et al. 2009, Liu et al. 2010, Watrous et al. 2010], Pflanzenblätter [Cha et al. 2009, Hamm et al. 2010] und –äste [Anderson et al. 2009], antikes Glas [Rutten FJM 2009], Quarz [Lehmann K 2009] und Fingerabdrücke [Lehmann K 2009, Bailey 2010, Tang et al. 2010] werden mittels MALDI-IMS analysiert. Dennoch findet MALDI-IMS in der biomedizinischen Forschung den größten Anklang.

1.2 Die Familie der kalziumbindenden S100-Proteine

Kalzium (Ca^{2+}) ist ein intrazellulärer sekundärer Botenstoff, der eine Vielzahl zellulärer Prozesse, wie z.B. Zellzyklusregulation, Zellwachstum und -differenzierung sowie Apoptose und Zellmotilität kontrolliert [Hermann et al. 2012]. Sogenannte Ca^{2+} -Sensor-Proteine sind für die räumliche und zeitliche Verteilung von Ca^{2+} in der Zelle sowie für die Weiterleitung des intrazellulären Ca^{2+} -Signals verantwortlich [Santamaria-Kisiel et al. 2006]. Dabei bilden die Ca^{2+} -bindenden Proteine, die durch ein EF-Hand Strukturmotiv gekennzeichnet sind, die größte Gruppe dieser Ca^{2+} -Sensor-Proteine [Kawasaki et al. 1998].

1.2.1 Struktur der S100-Proteine

Die S100-Proteine, welche 1965 von Moore beschrieben wurden [Moore 1965], sind die größte Unterfamilie der kalziumbindenden Proteine. Mit 9-14 kDa sind es relativ kleine Proteine, die ausschließlich in Vertebraten und dort wiederum spezifisch in verschiedenen Zelltypen und Geweben exprimiert werden [Schafer et al. 1996]. Die Bezeichnung „S100“ beruht auf der Löslichkeit der Proteine in einer 100 %igen Ammoniumsulfatlösung [Moore 1965].

Strukturell sind die Proteine der S100-Familie durch zwei Kalzium-Bindungsstellen des EF-Hand-Typs charakterisiert. Diese sind jeweils aus einem Helix-Loop-Helix-Motiv aufgebaut. Die EF-Hände bestehen aus zwei α -Helices (E- und F-Helix), welche durch eine kalziumbindende Schleife (Loops) miteinander verbunden sind. Beide EF-Hände sind wiederum durch eine zentrale *hinge*-Region

verbunden und werden durch N- und C-terminale hydrophobe Regionen flankiert (Abb. 1). Diese Regionen können als Antwort auf eine Kalziumbindung ihre Konformation ändern und dabei hydrophobe Regionen an der Oberfläche des Moleküls exponieren. Jene wiederum interagieren mit hydrophoben Regionen von S100-Zielproteinen [Donato 2001, Marenholz et al. 2004]. Innerhalb eines S100-Proteins zeichnen sich die Ca^{2+} -Bindungsstellen durch unterschiedliche Affinitäten aus, wobei die 12 Aminosäuren große C-terminale Schleife eine höhere Kalzium-Affinität aufweist als die 14 Aminosäuren große N-terminale Schleife [Donato 1986]. Einige S100-Proteine können neben Ca^{2+} auch Zink [Donato 1991, Schafer et al. 1995, Zimmer et al. 1995] und Kupfer [Nishikawa et al. 1997, Schafer et al. 2000] mit einer hohen Affinität binden. Die größte Sequenzhomologie innerhalb der Proteinfamilie findet man in den Ca^{2+} -Bindungsstellen, wohingegen sich die *hinge*-Region und die C-terminale Region der Proteine durch eine hohe Variabilität auszeichnen. Diesen beiden Regionen wird aufgrund der geringen Homologie eine spezifische Rolle in der biologischen Aktivität der verschiedenen S100-Proteine zugeschrieben.

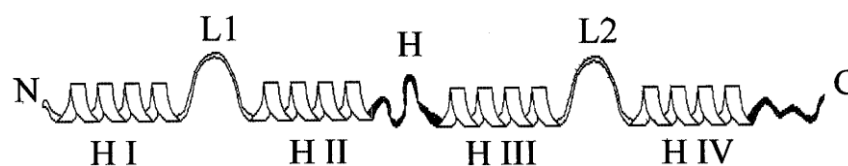


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Sekundärstruktur der S100-Proteine

Jede Ca^{2+} -Bindungsstelle (L1 und L2) wird durch zwei α -Helices (H I und H II der N-terminalen und H III und H IV der C-terminalen Ca^{2+} -Bindungsstelle) flankiert. Eine *hinge*-Region (H) verbindet Helix II mit Helix III und damit beide EF-Hände. Nach Donato 2001 [Donato 2001].

Die meisten S100-Proteine liegen innerhalb der Zelle als Homo- oder Heterodimere mit antiparalleler Ausrichtung vor. Dabei werden S100-Monomere über eine nicht-kovalente Bindung zusammengehalten. Durch die Bindung von Ca^{2+} an die beiden EF-Hände kommt es zur Konformationsänderung im Molekül, was zu einer Exposition hydrophober Domänen an der Oberfläche führt [Baudier et al. 1983]. Es entsteht ein Heterotetramer aus zwei S100-Proteinen und zwei Zielproteinen. Über den Effekt der Kalziumbindung interagieren S100-Proteine sowohl untereinander als auch mit anderen Proteinen. Auch Hexamer- und Oligomerstrukturen wurden für einige S100-Proteine beschrieben [Donato 2003, Moroz et al. 2003]. Die Ausbildung der Dimerkomplexe scheint von wesentlicher Bedeutung für die vielen physiologischen Funktionen, die bisher für die S100-Proteine beschrieben wurden, zu sein [Schafer et al. 1996, Donato 2003, Marenholz et al. 2004].

1.2.2 Biologische Funktion der S100-Proteine

S100-Proteine sind multifunktionale Proteine, die in vielfältiger Weise intra- und extrazelluläre Prozesse regulieren. So sind sie an einer Vielzahl zellbiologischer Prozesse beteiligt. Sie regulieren die Phosphorylierung, indem sie mit Kinasen interagieren. Sie interagieren mit Transkriptionsfaktoren sowie mit Filamenten des Zytoskeletts. Somit üben sie einen Einfluss auf Zellwachstum und Motilität [Brozzi et al. 2009, Chen et al. 2009], Zellzyklus [Arcuri et al. 2005, Brozzi et al. 2009], Differenzierung [Beccafico et al. 2011, Liu et al. 2011, Riuzzi et al. 2011] und Apoptose [van Dieck et al. 2009, Lin et al. 2010, Tubaro et al. 2011] aus.

Einige Mitglieder der S100-Familie können von Zellen sezerniert werden, wobei sie extrazellulär zytokin- und chemokinähnliche Funktionen ausüben [Van Eldik et al. 1994, Kerkhoff et al. 1998, Mandinova et al. 1998, Brett et al. 2001, Davey et al. 2001]. Desweiteren können S100-Proteine

extrazellulär auf Membran-gebundene Rezeptoren oder Ionen-Kanäle wirken. Ein solcher Rezeptor ist RAGE (*receptor for advanced glycation end products*), der in entzündeten Geweben und verschiedenen Tumoren lokalisiert ist. Durch die Bindung der S100-Proteine an den Multiligand-Rezeptor leitet dieser die Signale in das Innere der Zelle weiter und aktiviert die entsprechenden Signalwege. RAGE wird durch eine Vielzahl von S100-Proteinen (S100A1, S100A2, S100A5, S100A7, S100A8/A9, S100A11, S100A12, S100A13, S100B und S100P) in vielen verschiedenen Zelltypen gebunden [Donato 2007, Heizmann et al. 2007, Ghavami et al. 2008, Leclerc et al. 2009, Beccafico et al. 2011, Eggers et al. 2011]. Zusätzlich übertragen G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, *Scavenger*-Rezeptoren und TLR4 (*toll-like receptor 4*) Effekte auf verschiedene S100-Proteine [Vogl et al. 2007, Yan et al. 2008, Pietzsch et al. 2009, Hoppmann et al. 2010]. S100A4 und S100B interagieren mit Liganden des EGFR (*epidermal growth factor receptor*) sowie des FGR (*fibroblast growth factor*) [Klingelhofer et al. 2009, Riuzzi et al. 2011, Riuzzi et al. 2012]. Als Sekretionsprodukte binden einige S100-Proteine an weitere Rezeptoren auf inflammatorischen, epithelialen und neuronalen Zellen [Donato 2003, Striz et al. 2004].

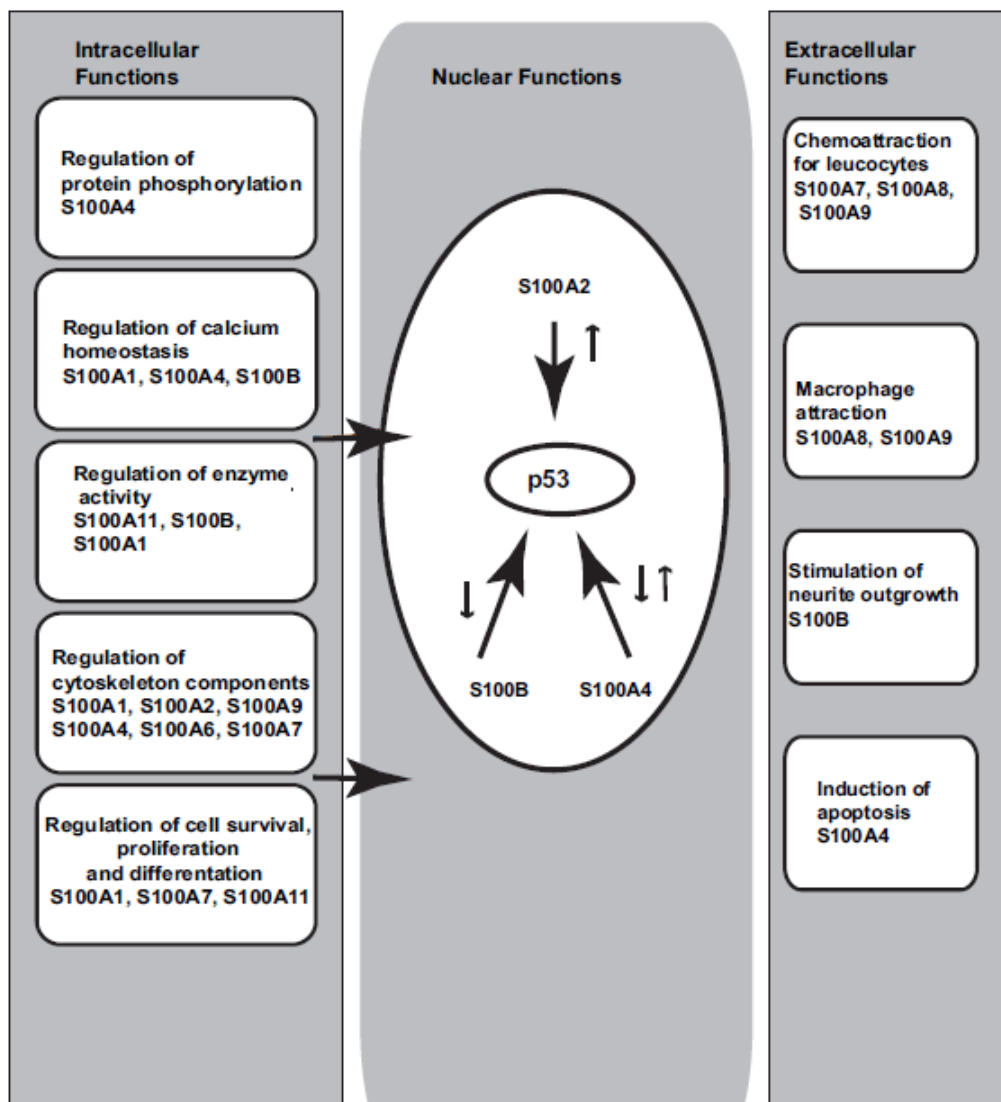


Abbildung 2: S100-Proteine und ihre Funktionen

Dargestellt sind die intra- und extrazellulären Funktionen der S100-Proteine. Nach [Salama et al. 2008].

Mit wenigen Ausnahmen (S100A11P, S100B, S100G, S100P und S100Z) sind alle bisher identifizierten S100-Proteine auf Chromosom 1q21 kodiert [Marenholz et al. 2004]. Für alle Mitglieder der S100-Proteinfamilie gilt, dass ihre Exon/Intron-Struktur hoch konserviert ist. Mit Ausnahme von S100A5, das vier Exons und drei Introns aufweist [Engelkamp et al. 1993], sind alle anderen S100-Proteine durch drei Exons und zwei Introns gekennzeichnet. Das erste Exon bleibt untranslatiert, Exon zwei und drei kodieren für jeweils eine EF-Hand [Ghavami et al. 2009]. Strukturelle Umordnungen oder Deletionen dieser chromosomalen Region sind oft mit einer Deregulation der Expression der S100-Gene in verschiedenen Tumorarten verbunden, was wiederum zu einer Tumor- und Metastasenausbildung führt [Emberley et al. 2004, Moinzadeh et al. 2005]. Klinische und experimentelle Studien zeigen, dass die Expression einiger S100-Proteine in verschiedenen Tumoren mit der Tumorentwicklung korreliert [Marenholz et al. 2004, Salama et al. 2008]. Die meisten S100-Proteine zeigen ein verändertes Expressionsniveau in Tumorzellen im Vergleich zu gesunden Zellen. S100A4, S100A6, S100A7 und S100B liegen stark überexprimiert in Tumorzellen vor [Ilg et al. 1996, Maeldandsmo et al. 1997]. Eine erhöhte Expression von S100A6 und S100P konnte in Brust- Lungen- und Pankreastumoren nachgewiesen werden [Guerreiro Da Silva et al. 2000, Hsieh et al. 2003]. Die Expression von S100A2 wird gegenwärtig konträr diskutiert. Zeigen Studien von 2005 eine stark herabgesetzte Expression des Proteins in Tumorzellen im Zusammenhang mit einer Tumorsuppressor-Funktion [Mueller et al. 2005] konnte in neueren Studien eine Überexpression des Proteins in Brusttumoren gezeigt werden [McKiernan et al. 2011]. Desweiteren können selbst in unterschiedlichen spezifischen Zellen innerhalb eines Organs unterschiedliche Expressionsraten spezifischer S100-Proteine detektiert werden [Emberley et al. 2004, Melle et al. 2004]. Trotz der hohen Sequenzhomologie und gleicher struktureller Eigenschaften, zeigen die Proteine der S100-Familie kein einheitliches Bild hinsichtlich ihrer Rolle in Tumoren, ihrer Verteilung in Geweben und der von ihnen vermittelten Aktivitäten. Meist ist die Funktion der S100-Proteine in der Tumorzelle noch unbekannt und bedarf intensiver Studien.

1.3 Die kalziumbindenden Proteine S100A8 und S100A9

Die Proteine S100A8 (MRP8) und S100A9 (MRP14) gehören zur Familie der kalziumbindenden S100-Proteine. Beide können, wie viele andere S100-Proteine als Homodimere in der Zelle vorliegen. Dennoch bilden sie bevorzugt ein funktionelles, antiparalleles Heterodimer, auch bekannt als Calprotectin oder Ca^{2+} -induzierte Tetramere [Donato 2001, Heizmann et al. 2002, Leukert et al. 2006]. Beide Proteine wurden bei dem Versuch, den humanen Makrophagen-Migrations-Inhibitions-Faktor (MIF) mit Hilfe des monoklonalen Antikörpers 1C5 zu isolieren, aufgereinigt [Burmeister et al. 1986]. Da beide Proteine selber keine Migrations- inhibierenden Aktivitäten zeigten, wurden sie als „MIF- related proteins“ (MPRs) bezeichnet. Die Zahlen 8 bzw. 14 geben die relative molekulare Masse der Proteine im SDS-PAGE an [Odink et al. 1987].

Für beide S100-Proteine sind unterschiedliche Synonyme bekannt. So wird MRP8 auch als p8, Calgranulin-A, Calprotectin L1L Untereinheit oder Cystic fibrosis antigen (CFAG) bezeichnet. MRP14 ist auch unter den Synonymen p14, Calgranulin-B und Calprotectin L1H Untereinheit bekannt. Nach der neuen Nomenklatur, die sich auf der Anordnung der Gene auf dem humanen Chromosom 1q21 bezieht, wird MRP8 als S100A8 und MRP14 als S100A9 bezeichnet [Schafer et al. 1995].

Die Gene, die für S100A8 und S100A9 kodieren, liegen in einem Gencluster auf Chromosom 1q21. Beide Gene enthalten 3 Exons, sind „single copy“ und haben eine auffallend ähnliche Struktur [Lagasse et al. 1988]. Die Sequenz der humanen S100A8-cDNA weist einen offenen Leserahmen von

279 Nukleotiden auf, der für ein 93 AS großes Protein mit einem Molekulargewicht von 10 835 Da kodiert. Die Sequenz der humanen S100A9-cDNA besteht aus einem offenen Leserahmen von 342 Nukleotiden und kodiert für ein Protein mit 114 AS und einem Molekulargewicht von 13 242 Da. Beide Sequenzen weisen weder Transmembranregionen noch spezifische Signalsequenzen auf, über die eine Translokation der Proteine an die Plasmamembran erfolgen könnte [Odink et al. 1987].

1.3.1 Spezifische Expression von S100A8 und S100A9

S100A8 und S100A9 werden konstitutiv in sich differenzierenden myeloischen Zellen, wie neutrophilen Granulozyten, Monozyten, Osteoklasten und frühen Differenzierungsstadien myeloischer Zellen, jedoch nicht in Lymphozyten und Thrombozyten exprimiert [Roth et al. 2003, Cheng et al. 2008, Sinha et al. 2008, Goyette et al. 2011]. S100A8 und S100A9 umfassen 45 % der neutrophilen, cytosolischen Proteine. Die Expression beider Proteine in myeloischen Zellen hängt vom Stadium der Differenzierung ab. Monozyten exprimieren S100A8 und S100A9 in geringen Mengen [Hessian et al. 1993, Hsu et al. 2005]. Während der Differenzierung von peripheren Blutmonozyten zu Makrophagen wird die Expression stark herunterreguliert [Lagasse et al. 1988, Zwadlo et al. 1988]. Dagegen zeichnen sich Makrophagen eines entzündlichen Infiltrats durch eine stark erhöhte Expression aus [Odink et al. 1987, Delabie et al. 1990, Terasaki et al. 2007]. Auch in Keratinozyten und Epithelzellen konnten beide Proteine unter entzündlichen Bedingungen in großen Mengen nachgewiesen werden [Palmer et al. 1987, Zwadlo et al. 1988, Kelly et al. 1989]. TLR-Liganden wie LPS und Zytokine wie TNF α , TGF- β , IL-1 α , IL-1 β , IL-10, IL-22 und IFN γ induzieren die Expression von S100A8 und S100A9 [Gebhardt et al. 2006, Nemeth J 2009, Goyette et al. 2011]. Da auch anti-inflammatorische Zytokine, wie IL-10 die Expression von S100A8/A9 induzieren, wird vermutet, dass S100A8 und S100A9 gegensätzliche Funktionen während Entzündungsprozessen ausüben [Srikrishna 2012]. Außerdem induzieren Norepinephrine S100A8 und S100A9, was deren Regulation durch Stress vermuten lässt [Suryono et al. 2006].

1.3.2 Biologische Funktion von S100A8/A9

In vitro Studien zeigen, dass das Heterodimer aus S100A8/A9 bei intrazellulären homeostatischen Prozessen, wie der Regulation des intrazellulären Ca²⁺-Spiegels, Aktivierung der NADPH-Oxidase und von NF- κ B sowie dem Arachidonsäure-Transport beteiligt ist [Kerkhoff et al. 1999, Donato 2001, Roth et al. 2003]. Der Proteinkomplex spielt außerdem eine Rolle bei der Tubulin-abhängigen Zytoskelett-Umordnung während der transendothelialen Migration von Phagozyten [Eue et al. 2000, Vogl et al. 2004]. Neben der intrazellulären Expression und der auf der Zelloberfläche, wurde S100A8/A9 auch im extrazellulären Medium detektiert. Extrazelluläres S100A8/A9 fungiert als Gefahr-Signal, fördert Immunantworten und Reparaturmechanismen während Entzündungsprozessen und spielt außerdem eine Rolle in Tumoren. S100A8/A9 ist ein gut untersuchter Marker für Entzündungen, wie Rheumatoide Arthritis, chronisch entzündliche Darmerkrankungen, Multiple Sklerose, zystische Fibrose und Psoriasis. Ein erhöhter Serumspiegel von S100A8/A9 wird mit Diabetes, Lupus Erythematodes, Arteriosklerose, Vaskulitis, Hyperzinkämie und anderen inflammatorischen Krankheiten in Verbindung gebracht [Roth et al. 2003, Gebhardt et al. 2006, Foell et al. 2007]. Erhöhte Serumspiegel finden sich ebenso bei Transplantatabstoßungen [Burkhardt et al. 2001], Geweben aus kolorektalen Karzinomen [Stulik et al. 1999, Stulik et al. 1999] und es konnte eine Korrelation vom Serumspiegel mit dem Krankheitsstadium einer HIV-Infektion gezeigt werden [Lugering et al. 1995]. Die erhöhten Serumspiegel, die im Rahmen der genannten Erkrankungen auftreten, werden dabei auf eine Stimulus-induzierte Freisetzung der beiden Proteine aus aktivierten

Leukozyten zurückgeführt [Rammes et al. 1997, Frosch et al. 2000] und korrelieren mit der Aktivität inflammatorischer Prozesse. Dementsprechend werden beide Proteine als Entzündungsmarker in der Diagnostik eingesetzt. Desweiteren wird den kalziumbindenden Proteinen S100A8 und S100A9 eine Rolle bei der Wundheilung zugesprochen, da sie eine signifikant hohe Expression in sich differenzierenden Keratinozyten der suprabasalen Schichten zeigen. Außerdem wird die Expression beider Proteine durch UVB-Bestrahlung induziert [Dazard et al. 2003]. Aufgrund dieser Beobachtung werden diese Proteine auch als „Stress-induzierte Proteine“ charakterisiert [Eckert et al. 2004].

1.3.3 Pathologie von S100A8 und S100A9

Auch die Gene, die für S100A8 und S100A9 kodieren, liegen auf der chromosomalen Region 1q21, eine Region die bei Tumoren häufig Deletionen, Translokationen und Duplikationen unterliegt. Aus diesem Grund wird beiden Proteinen eine Rolle bei der Tumorentstehung und Progression zugeschrieben [Donato 2001, Heizmann et al. 2002]. Proteinexpressionsstudien haben gezeigt, dass S100A8 und S100A9 im Vergleich zu Normalgewebe in verschiedenen malignen Tumoren differentiell exprimiert vorliegen. Im pankreatischen Adenokarzinom [Shen et al. 2004], im Blasen- [Yao et al. 2007], Magen- [Yong et al. 2007] und Brust-Karzinom [Cross et al. 2005, Salama et al. 2008] sowie in prostatistischen intraepithelialen Neoplasien ist die Proteinexpression von S100A8 und S100A9 stark erhöht, wohingegen gutartiges Gewebe keine oder nur eine geringe Expression beider Proteine aufweist. Außerdem konnte in einem chemisch induzierten Hautkrebs- Maus-Modell ein hohes Transkriptionslevel von S100A8 detektiert werden. Diese erhöhte Expression beider S100-Proteine scheint mit einem gesteigerten pathologischen Tumorgrad zu korrelieren [Hummerich et al. 2006]. Im Gegensatz dazu ist die Proteinexpression von S100A8 und S100A9 im Plattenepithelkarzinom des Kopf-Hals-Bereiches im Vergleich zu gesunden Gewebe stark herabgesetzt und scheint mit einer Tumorsuppression zu korrelieren [Zhi et al. 2003, Ji et al. 2004, Melle et al. 2004]. Desweiteren wird in einigen Studien die Expression von S100A8 und S100A9 mit dem Grad der Invasivität in Verbindung gebracht [Seth et al. 2003, Arai et al. 2004, Li et al. 2004, Nagaraja et al. 2006, Bode et al. 2008]. Es konnte außerdem ein Gradient innerhalb des Tumors mit einer erhöhten Expression im invadierten Stroma beobachtet werden. Das lässt darauf schließen, dass die erhöhte Expression von S100A8 und S100A9 ein Stadium der Tumorgenese darstellt. Obwohl die genaue Funktion von S100A8 und S100A9 bei der Tumorentstehung und -progression nicht geklärt ist, kann das spezifische Expressionsmuster beider S100-Proteine als diagnostischer Marker z. B. im Serum für die Unterscheidung zwischen Prostatatumoren und einer benignen Prostatahyperplasie verwendet werden [Hermani et al. 2005].

Weiterhin wird den S100-Proteinen A8 und A9 eine Rolle bei der Regulation der Zellproliferation zugeschrieben [Cross et al. 2005, Hermani et al. 2006]. S100A8 und S100A9 spielen außerdem eine Rolle bei metastatischen Prozessen. Es konnte gezeigt werden, dass Primärtumoren lösliche Faktoren, wie VEGF-A, TGF β und TNF α sekretieren, die die Expression von S100A8 und S100A9 in myeloischen und endothelialen Zellen der Lunge vor der Tumormetastasierung induzieren und die Wanderung von Tumorzellen zu premetastatischen Nischen fördern [Hiratsuka et al. 2006, Rafii et al. 2006].

1.3.4 S100A8 und S100A9 sind Liganden für RAGE

In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass geringe Konzentrationen ($> 25 \mu\text{g/ml}$) von S100A8/A9 die Proliferation von verschiedenen humanen Krebszelllinien (MCF-7, MDA-MB231, SHEP und Kelly) fördern [Ghavami et al. 2008]. Diese wachstumsfördernde Aktivität wird durch den

Rezeptor RAGE (*receptor for advanced glycation end products*) geleitet. RAGE ist ein Multiligand-Rezeptor der Immunglobulin-Superfamilie, an den auch die Proteine S100A8 und S100A9 binden. Die Interaktion von RAGE mit S100A8/A9 führt zur intrazellulären Aktivierung der p38- und p44/42-MAP-Kinase, was wiederum die NF- κ B-Signalkaskade auslöst. Diese führt zur Bildung von Wachstumsfaktoren, Zytokinen und sRAGE (soluble/lösliches RAGE). sRAGE bindet ebenfalls an RAGE und steht so unmittelbar in Konkurrenz zu S100A8/A9. Somit wird die S100A8/A9 vermittelte Proliferation inhibiert [Ghavami et al. 2008].

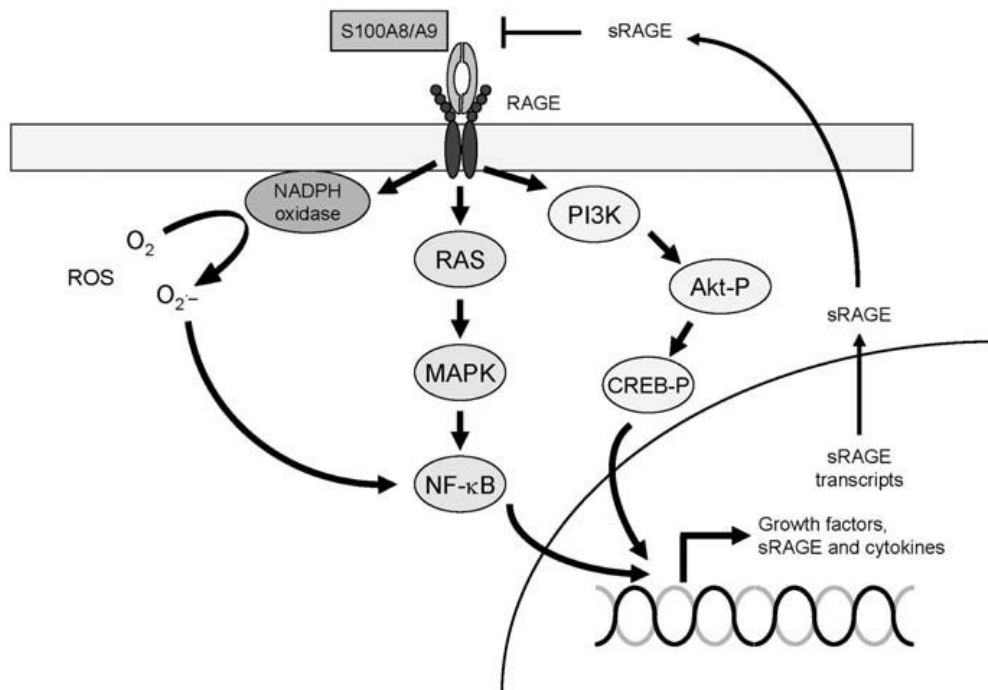


Abbildung 3: S100A8/A9 fördert die Proliferation verschiedener Krebszelllinien

S100A8/A9 induziert die Zellproliferation durch Bindung an RAGE. Diese Ligation bewirkt die Aktivierung des PI3K-Akt- NF- κ B-Signalwegs. Dabei werden Wachstumsfaktoren, Zytokine und sRAGE gebildet. sRAGE konkurriert mit S100A8/A9 um die RAGE-Bindung, was wiederum zu einer verminderten Proliferation der Zielzellen führt. PI3K = Phosphoinositol-3-Kinase; Akt = Akt/Proteinkinase B; CREB = cAMP response element binding protein; MAPK = mitogen-activated protein kinase; ROS = reactive oxygen species; sRAGE = soluble receptor of advanced glycation endproducts. Nach [Ghavami et al. 2009].

1.4 Die Familie der Annexine

Annexine gehören zu einer Familie von Kalzium- und Phospholipid- bindenden Proteinen [Mollenhauer 1997]. Die Familie wurde in den späten 1970ern und frühen 1980ern beschrieben. Der Name kommt aus dem griechischen *annex*: etwas zusammenbringen, zusammenhalten. Dies beschreibt die prinzipielle Eigenschaft von fast allen Annexinen: sie vermitteln die Bindung an und möglicherweise auch das Zusammenhalten von verschiedenen biologischen Strukturen, besonders von Membranen [Gerke et al. 2002]. Annexin-Proteine sind durch zwei maßgebliche Eigenschaften charakterisiert. Die 70 Aminosäuren lange Polypeptidkette, das sogenannte „Annexin repeat“, ist in vier wiederholte α -helikale Domänen ähnlicher Struktur mit einem zentralen hydrophoben Kern gefaltet. Das zweite charakteristische Merkmal ist die Ausbildung Ca²⁺-abhängiger Bindungen an Phospholipide, vor allem an negativ geladene Phospholipide [Gerke 2001].

Annexine sind zytosolische Proteine, die sowohl in einer gelösten Form als auch in einer Form vorkommen, die stabil oder reversibel mit Komponenten des Zytoskeletts oder mit Proteinen, die die

Interaktionen zwischen der Zelle und der extrazellulären Matrix vermitteln, assoziiert sind. Einige Annexine (Annexin XI und Annexin II) wurden auch unter besonderen Umständen im Kern gefunden [Eberhard 2001, Andarawewa et al. 2003].

Für Annexine gibt es zahlreiche Namen, die sich auf deren biologischen Eigenschaften beziehen. Dazu gehören Synexin (für Granula-aggregierendes Protein [Creutz et al. 1978]), Chromobindin (Proteine, die an Chromaffin Granulas binden [Creutz et al. 1987]), Calzimedlin (Proteine, die Kalzium-Signale vermitteln [Moore et al. 1984]), Lipocortin (Steroid-induzierte Lipase-Inhibitoren [Flower 1986]) und Calpactin (Proteine, die Kalzium, Phospholipide und Aktin binden [Glenney et al. 1987]). Intensive biochemische Arbeiten, Protein- und cDNA-Sequenzierungen und Klonierungen haben gezeigt, dass all diese Proteine gleiche biochemische Eigenschaften und auch gleiche Genstrukturen und Sequenzhomologien aufweisen. Somit entstand eine neue Multigen-Familie mit dem Namen „Annexin“ [Crumpton et al. 1990]. Bis heute sind mehr als 160 Annexin-Proteine, davon 12 humane [Domon et al. 2012], in mehr als 65 verschiedenen Arten, vom Pilz über Protisten bis hin zu Pflanzen und höheren Vertebraten bekannt [Morgan et al. 1997, Morgan et al. 1999, Bandorowicz-Pikula et al. 2001]. Trotz dieser sehr weiten Verbreitung sind die physiologischen Funktionen noch weitgehend unbekannt [Kenis et al. 2007].

1.4.1 Molekulare Struktur der Annexine

Annexine bestehen aus dem NH₂-terminalen „Kopf“ und dem konservierten COOH-terminalen Protein-Kern. Dieser beinhaltet die Kalzium- und Membranbinde-Domäne und ist für die Bindung an Membranen verantwortlich. Der Protein-Kern besteht aus vier (bei Annexin A6 aus acht) homologen Domänen, den so genannten „*Annexin repeats*“. Diese sind 70 Aminosäuren lang und zeigen eine Sequenzhomologie von 40 % bis 70 % [Smith et al. 1994]. Die „*repeats*“ bestehen aus einem Bündel von fünf α -Helices, die über kurze loops miteinander verbunden sind (Abb. 1). In den loops befinden sich die Kalzium- und Phospholipid-Bindungsstellen innerhalb einer 17 Aminosäure langen Konsensussequenz, dem „*Endonexin fold*“ [Geisow 1986, Kretsinger et al. 1986].



Abbildung 4: Kristallstruktur des humanen Annexin A5:

Die Abbildung zeigt die „*Annexin repeats*“, vier homologe Domänen aus jeweils fünf α -Helices. Die verschiedenen Farben zeigen die einzelnen repeats (grün-repeat I, blau-repeat II, rot-repeat III und violett/cyan-repeat IV). Die α -Helices sind durch loops verbunden. Darin befinden sich die Kalzium- und Phospholipid-Bindestellen (gelb-gebundenes Kalzium). Aus [Gerke et al. 2002].

Die erste kristallographische Struktur der Annexin Kern-Domäne wurde von Huber 1990 für Annexin A5 aufgeklärt [Huber et al. 1990]. Heute sind mehr als zehn Kristallstrukturen für „Annexin repeats“ bekannt, die die hohe Konservierung dieser Proteine zeigen [Huber et al. 1992, Liemann et al. 1995, Gerke et al. 2002].

Im Kontrast zu der homologen Annexin Kern-Domäne steht die aminoterminal Region der Annexine, deren Tertiärstruktur nur wenig aufgeklärt ist. Diese variiert in Sequenz und Länge (11 bis 196 Reste) und bestimmt die zelluläre Funktion des Proteins [Liemann et al. 1997]. So finden sich in den Amino-Termini beispielsweise potentielle Bindungsstellen für Proteine, die an der Signaltransduktion beteiligt sind, wie der Proteinkinase C [Dubois et al. 1996] oder der Tyrosin-spezifischen Proteinkinase [Rothhut 1997].

Im Vergleich zu den Calmodulinen besitzen Annexine kein typisches EF-Hand-Motiv, sondern ein konserviertes Ca^{2+} -Bindungsmotiv mit der Sequenz [(Leu/Met)-Lys-Gly-XGly-Thr] gefolgt von einer sauren Aminosäure nach einem Abstand von ca. 40 Aminosäuren. In löslicher Form binden Annexine Kalzium sehr viel schwächer als beispielsweise Calmoduline über ihr EF-Hand-Motiv. Dennoch verstärkt die Membranbindung die Kalziumbindung über Annexine. Die Ca^{2+} -abhängige Bindung an Phospholipidmembranen in Blutplättchen ist mit einer Dissoziationskonstante im Nanomolekularen Bereich sehr hoch [Tait et al. 1989].

1.4.2 Biologische Funktion der Annexine

Aufgrund der kalziumabhängigen Bindung an biologische Membranen, stellen die Annexine eine Verbindung zwischen der Kalziumsignalwirkung und den Membran-assoziierten zellulären Funktionen, wie verschiedenen Signalwegen, Zell-Differenzierung und Migration, dar [Gerke et al. 2005]. Die Mitglieder der Annexin-Proteinfamilie werden ubiquitär exprimiert und fungieren als intrazelluläre Ca^{2+} -Sensoren. In den meisten Zellen liegen mehrere Annexine vor. Es wird angenommen, dass Annexine ihre biologische Funktion durch den Einfluss der Membran-Dynamik ausüben, indem sie die Membran-Segregation und die Membran-Fusion fördern [Gerke et al. 2005]. Zudem spielen Annexine eine Rolle bei Reparaturmechanismen der Plasmamembran durch die Regulation des Stress-, Toxin- oder Pathogen-bedingten extrazellulären Ca^{2+} -Einstroms [Draeger et al. 2011]. Die Kombination von verschiedenen Annexinen in den Zellen und deren individuellen Kalzium-Sensitivität erlaubt die räumlich begrenzte, abgestufte Antwort auf Membran-Verletzungen [Draeger et al. 2011]. Desweiteren spielen Annexine bei Signal-Transduktionsprozessen eine Rolle, bei denen sie sowohl Substrate, wie auch Regulatoren von verschiedenen Proteinkinasen [Rothhut 1997] sind und die Synthese von Lipid Second Messengern [Russo-Marie 1999] regulieren. Annexine sind außerdem bei der Sekretion von Neurotransmittern und Hormonen, bei der Rezeptor-vermittelten Endozytose, bei der Zellproliferation und Wachstumsregulation, bei Virusinfektionen und bei der Knochenbildung beteiligt [Raynal et al. 1994]. Sie können ihre intrazelluläre Lokalisation aufgrund der Fluktuation der intrazellulären Kalzium-Konzentration (in stimulierten Zellen) [Barwise et al. 1996, Sagot et al. 1997, Trotter et al. 1997] oder unter Stress (z. B. oxidativer Stress) [Hoyal et al. 1996] ändern. Neben diesen intrazellulären Funktionen gibt es auch Annexine, die außerhalb der Zelle auftreten. Zell-Oberflächen-Annexine agieren z. B. als Rezeptoren für Polypeptid-Liganden [Siever et al. 1997] und Viren [De Meyer et al. 1997, Pietropaolo et al. 1997]. Weitere extrazelluläre Funktionen von Annexinen sind Zell-Adhäsion, antiinflammatorische [Ahluwalia et al. 1996] oder antikoagulierende [Reutelingsperger et al. 1997] Aktivitäten.

Desweiteren spielen Annexine eine Rolle bei vielen Krankheiten wie der Tumorprogression, Diabetes, der Autoimmunkrankheit Antiphospholipid-Syndrom und anderen Krankheiten, die oft mit der Dysregulation des Vesikel-Transports in Verbindung stehen [Hayes et al. 2007, Lim et al. 2007, Fatimathas et al. 2010].

1.5 Annexin A5

Annexin A5 wurde erstmals in Knorpelzellen von Hühnern beschrieben. Bei der Suche nach einem Kollagen-Rezeptor in Chondrozyten haben Mollenhauer ein Protein namens Anchorin CII aus der Membran von Hühnerknorpelzellen durch Affinitätschromatographie von Typ-II-Kollagen isoliert [Mollenhauer et al. 1983, Mollenhauer et al. 1984]. Unabhängig davon wurde Annexin A5 von Bohn beschrieben [Inaba et al. 1984], die das Protein aus einer humanen Plazenta isolierten und es Plazenta Protein 4 (PP4) nannten. Außerdem isolierten von Reutelingsperger das Protein aus der Nabelschnur und nannten es aufgrund der antikoagulierenden Wirkung Vaskuläres-Antikoagulant α [Reutelingsperger et al. 1985]. Nach der Klonierung und Sequenzierung der humanen Annexin A5 cDNA, bekam das Protein seinen Namen aufgrund der Homologie zu den Mitgliedern der Annexin-Proteinfamilie [Iwasaki et al. 1987, Kaplan et al. 1988, Maurer-Fogy et al. 1988]. Heute sind viele Synonyme von Annexin A5 bekannt. Anchorin CII, Annexin V, Annexin-5, Calphobindin I (CBP-I), Endonexin II, Lipocortin V, Placental anticoagulant protein 4 (PP4), Placental anticoagulant protein I (PAP-I), Thromboplastin inhibitor, Vascular anticoagulant-alpha (VAC- α) bezeichnen alle das Protein Annexin A5, was wiederum die weiträumige Verbreitung in den Organismen und die Aktivität in diversen biologischen Systemen widerspiegelt [van Heerde et al. 1995].

Die physiologischen Funktionen von Annexin A5 sind wie von allen anderen Annexinen weitgehend unbekannt. Annexin A5 ist, wie die meisten Mitglieder der Proteinfamilie, in der Lage an negativ-geladene Phospholipide und Membranen zu binden. Es gibt Daten, die vermuten lassen, dass Annexine in der Membran-Organisation und -Dynamik, wahrscheinlich als „*scaffold-proteine*“ beteiligt sind [Rescher et al. 2004, Futter et al. 2007]. Die Interaktion von Annexin A5 mit der Zellmembran ist reversibel und hängt von der Anordnung der Phospholipide und der Kalzium-Konzentration ab [Schlaepfer et al. 1987, Andree et al. 1990, Meers et al. 1993].

Rekombinantes Annexin A5 ist als Marker für Apoptose bekannt. Dies basiert auf der Fähigkeit von Annexin A5, an Phospholipide zu binden, die während der Apoptose zur Zellaußenseite exponiert werden [van Heerde WL 2004]. In einem FACS-basierten Nachweis zur Apoptose werden apoptotische Zellen durch Markierung mit FITC-Annexin A5 durchflusszytometrisch nachgewiesen. In Anwesenheit von Kalzium bindet Annexin A5 an die meisten Phospholipide [Tait et al. 1989, Andree et al. 1990, Blackwood et al. 1990, Meers et al. 1991, Tait et al. 1992]. Während die Bindung an Phosphatidylcholin und Sphingomyelin nur sehr schwach ist [Andree et al. 1990], bindet es mit großer Affinität an negativ geladene Phospholipide wie Phosphatidylserin, da Annexin A5 eine Phosphatidylserin-spezifische Bindestelle aufweist [Swairjo et al. 1995]. Phosphatidylserin ist natürlicherweise auf der inneren Seite der Zellmembran, dem Zytosol zugewandt, lokalisiert. Durch ein ABC1-Transportersystem wird Phosphatidylserin während der Apoptose auf die äußere Schicht der Zellmembran transferiert [Marguet et al. 1999, Hamon et al. 2000]. Dort hat es koagulierende und inflammatorische Aktivitäten. Annexin A5 bindet an Phosphatidylserin auf der Membranoberfläche und inhibiert die Blutgerinnungs- und Entzündungsreaktionen. Der Effekt der Hemmung der Blutgerinnung durch Annexin A5 scheint vor allem in der Plazenta wichtig zu sein. Während der Schwangerschaft hindert Annexin A5 die Phosphatidylserin-abhängige Blutgerinnung in der Plazenta [Masuda et al. 2004].

Zudem gibt es Hinweise darauf, dass Annexin A5 direkt an der Apoptose beteiligt ist. Zellen, die kein Annexin A5 exprimieren, sind resistent gegenüber Kalzium-vermittelter Apoptose [Hawkins et al. 2002]. Zellen ohne Annexin A5 zeigen auch eine verminderte Caspase 3 Aktivität, ein früher Marker

für Apoptose [Leist et al. 1997]. So ist der Annexin A5 vermittelte Kalzium-Einstrom in Chondrozyten ein positiver Regulator der Apoptose [Wang et al. 2003].

Annexin A5 wird in Zellen exprimiert, die eine Barriere zwischen Geweben oder Körperflüssigkeiten bilden, wie endotheliale Zellen, Synzytiotrophoblasten und epithelialen Zellen des Choroid Plexus [van Heerde WL 2004]. Dies verstärkt die Hypothese, dass endogenes Annexin A5 als antikoagulierendes Protein agiert. Es wird auch eine Expression in Geweben, die an sekretorischen Prozessen beteiligt sind, wie in der Prostata, der Testis, den Langerhans'schen Inseln der Bauchspeicheldrüse und anderen Drüsen, beschrieben. Dies lässt vermuten, dass Annexin A5 entweder in sekretorische Prozesse involviert ist oder dass das Protein über sekretorische Prozesse ausgeschüttet wird [van Heerde WL 2004]. Jedoch besitzt das Protein keine Signalsequenz, die für die Sekretion von Proteinen notwendig ist [Fernandez et al. 1994].

Es konnte eine Interaktion zwischen Annexin A5 und der Proteinkinase C delta (δ PKC) nachgewiesen werden [Kheifets et al. 2006]. Die genaue Funktion der Annexin A5- δ PKC-Interaktion ist noch weitgehend unbekannt, aber es wird vermutet, dass Annexin A5 möglicherweise als „Protein-Shuttle“ auf Mikrotubuli dient. Damit wird δ PKC zum subzellulären Ziel befördert. Da keine direkte Interaktion zwischen Annexin A5 und den Mikrotubuli bekannt ist, wird vermutet, dass die Bewegung auf Annexin A5-vermittelten Membran-Vesikeln auf den Mikrotubuli basiert.

Es wurde vermutet, dass Annexin A5 eine Funktion in der Entwicklung und dem Wachstum des Skeletts besitzt [Kirsch et al. 1994, Brachvogel et al. 2001]. Annexin A5 Knock-Out Mäuse zeigen jedoch einen normalen Phänotyp. Sie sind lebensfähig, fertil und zeigen keine signifikanten Veränderungen in der Entwicklung der Skelettelemente [Brachvogel et al. 2003]. Auch die Verkalkung der Chondrozyten wird nicht wesentlich durch den Annexin A5-Verlust beeinflusst. Somit ist das Protein nicht für die Bildung und Aufrechterhaltung des Skeletts in den Mäusen essentiell.

Mittels ProteinChip Technologie wurde Annexin A5 in invasiven Tumorzellen gefunden. In der invasiven Front von Kopf-Hals-Tumoren (*head and neck squamous cell carcinoma* - HNSCC) lag das Protein signifikant hochreguliert vor [Melle et al. 2003]. Diese spezifische Überexpression lässt sich nicht mit den bisher bekannten Funktionen von Annexin A5 erklären, denn in Tumorzellen findet weder Apoptose, noch Blutgerinnung statt. Diese Beobachtung lässt vermuten, dass Annexin A5 eine weitere Funktion ausübt und möglicherweise die Invasivität und Metastasierung des Tumors reguliert.

1.6 Die epithelial-mesenchymale Transition (EMT) fördert die Tumormetastasierung

Epithelial-mesenchymale Transition (EMT) ist ein zellulärer Prozess, bei dem epitheliale Zellen die polarisierte Organisation und die Zell-Zell-Verbindungen auflösen und Veränderungen in Zellform und zytoskelettaler Organisation unterlaufen. Dabei erlangen sie mesenchymale Merkmale, wie die Fibroblasten-ähnliche Zellmorphologie und die gesteigerte Zellmigration und -Invasion. EMT wurde als erstes als ein Zell-Differenzierungs-Prozess in den späten 1970ern beschrieben und bekam zunehmend Aufmerksamkeit, da es nicht nur ein Prozess der Embryonalentwicklung ist, sondern auch zu pathologischen Veränderungen führt [ED 1968]. Funktional gesehen, kann EMT in 3 verschiedene Untertypen eingeteilt werden: Typ 1 EMT ist assoziiert mit embryonaler Implantation und Gastrulation und der Zellmotilität der Neuralleiste. Typ 2 EMT spielt eine Rolle bei der Wundheilung, der Geweberegeneration und bei Entzündungs- und Fibroseprozessen. Und Typ 3 EMT beschreibt den Übergang von epithelialen Tumorzellen zu motilen mesenchymalen Tumorzellen, was

zur Tumordinvasion, der systemischen Ausbreitung des Tumors und schließlich zur Metastase führt [Kalluri et al. 2009].

EMT bewirkt den Verlust epithelialer Marker, wie den Tight-Junction-Proteinen Claudin und Occludin, den Adherent-Junction Proteinen E-Cadherin, α - und β -Catenin und Zytokeratinen. Desweiteren wird die Expression von vielen mesenchymalen Markern erhöht. Dazu zählen N-Cadherin, Vimentin, Fibronectin, Matrix-Metalloproteinase, Integrin α v und β 1 und Aktin [Kang et al. 2004, Thiery et al. 2006, Yang et al. 2008]. Studien haben gezeigt, dass während des Prozesses der EMT hunderte Gene ihre Genexpression verändern [Kalluri et al. 2009, Polyak et al. 2009]. In den letzten Jahren wurde eine Fülle von Genen identifiziert, die bedeutend für EMT und Metastasen-Bildung sind. Der Prozess der EMT induziert nicht nur eine gesteigerte Tumorzell-Motilität und –Invasivität, sondern unterdrückt gleichzeitig Apoptose, Seneszenz und Immunabwehr. EMT scheint eine bedeutende Rolle in der Bildung und Aufrechterhaltung von Tumorstammzellen zu spielen, mit Bedacht darauf, dass metastatische Zellen das Potential tragen einen neuen Tumor zu bilden [Tiwari et al. 2012].

Die Entstehung von Metastasen ist ein sehr komplexer und dynamischer, zellulärer Prozess, bei dem eine Anzahl von Interaktionen zwischen Tumorzellen untereinander und mit dem umgebenden Gewebe stattfinden. Schematisch kann der Prozess der Metastasierung in verschiedene Schritte eingeteilt werden. Zu Beginn lösen sich einzelne Zellen vom Primärtumor ab, ein Prozess, der *tumor cell dissociation* genannt wird. Dissoziierte Tumorzellen infiltrieren in umliegendes Stroma (*Invasion*) und dringen in das vaskuläre oder lymphatische System ein (*Intravasation*). Über den Blut- oder Lymphstrom gelangen die Tumorzellen passiv zu entfernteren Organen, wo sie in kleinen Vesikeln arretieren. Anschließend verlassen sie das Gefäßsystem (*Extravasation*) und dringen in die Zielorgane ein (*Invasion*). Die Invasion in das Zielorgan bedeutet nicht zwingend, dass sich klinisch eine Metastase entwickelt, da eingewanderte Tumorzellen vom Immunsystem erkannt und getötet werden können. Außerdem können die Tumorzellen für mehrere Jahre in Ruhestellung bleiben [Engers et al. 2000]. Nach einer bestimmten Zeit können die Tumorzellen durch äußere Einflüsse stimuliert werden, die Proliferationsaktivität wird verstärkt und klinisch apparente Sekundärtumore werden gebildet. Der komplette Prozess der Metastasierung ist noch nicht vollständig verstanden und ist Gegenstand der aktuellen Forschung.

Mit dem Blick auf eine einzelne Tumorzelle ist die Metastasierungskaskade eine „Alles-oder-Nichts-Reaktion“, das heißt, die Metastasenbildung ist nur erfolgreich, wenn eine einzelne Tumorzelle in der Lage ist, jeden einzelnen Schritt der Kaskade zu durchlaufen. In Anbetracht dessen ist Metastasierung ein sehr ineffektiver Prozess. Obwohl Millionen Tumorzellen in die Blutzirkulation eintreten, sind nur weniger als 0,05 % der zirkulierenden Tumorzellen erfolgreich und treten in ein Zielgewebe ein [Liotta et al. 1974, Nicolson 1991]. Doch das permanente Durchlaufen der Metastasierungskaskade kann genügend Tumorzellen hervorbringen, die alle Barrieren überwinden und eine klinisch relevante Metastase bilden können [Engers et al. 2000].

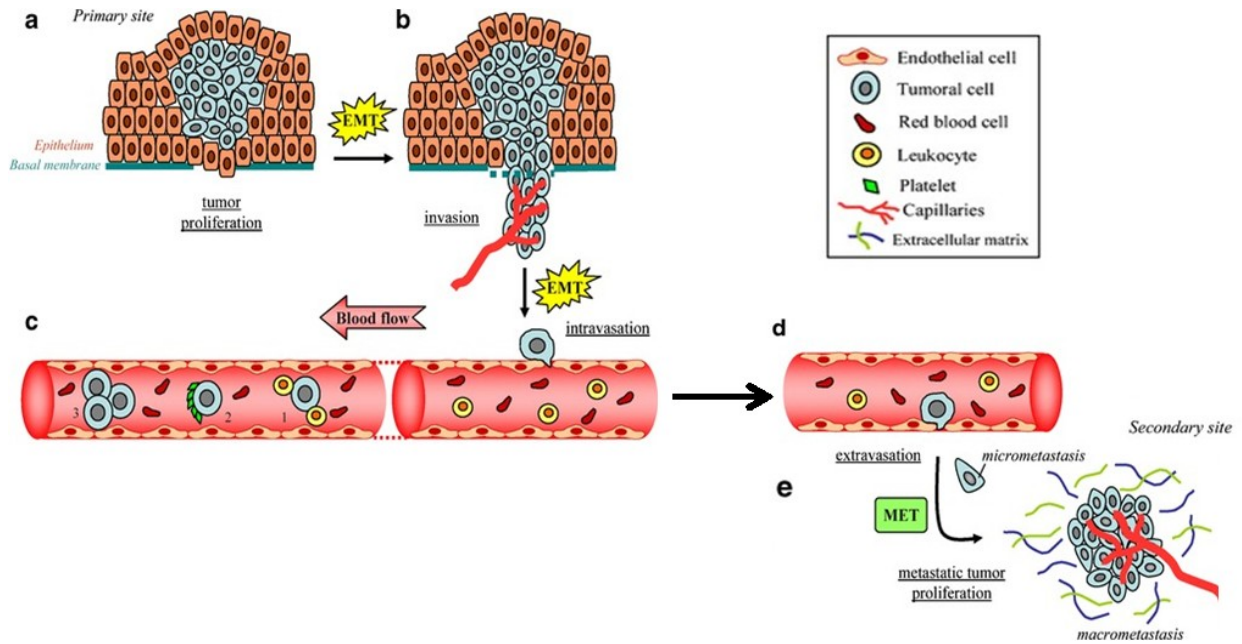


Abbildung 5: Der Weg einer metastatischen Zelle

Metastasierende Zellen müssen folgende Schritte auf dem Weg zur Metastase durchlaufen: a) Proliferation des Primärtumors, b) lokale Invasion der Zellen, c) Intravasation in die Kapillaren, d) Extravasation in das Zielorgan, e) metastatisches Wachstum und Bildung eines Sekundärtumors. [Gout et al. 2008]

2 Material

2.1 Arbeitsgeräte

Massenspektrometrie

- Objektträger für MALDI-Imaging, Bruker Daltonik
- ImagePrep station, Bruker Daltonik
- Ultraflex III MALDI-TOF/TOF, Bruker Daltonik
- SELDI-MS ProteinChip® System Series 400, Ciphergen
- CM10-ProteinChip® Array, Cationic Phase, Ciphergen
- Kryotom Leica CM 1850, Leica
- Rotilabo®-Exsikkator, Carl Roth
- Kamera Canon Power Shot G6, Canon
- laser microdissection and pressure catapulting microscope (LMPC), P.A.L.M./Zeiss
- PALM-Objektträger, P.A.L.M.

Zellkultur

- Gewebekulturflaschen 25cm² und 75cm², Greiner Bio One GmbH
- Gewebekulturflaschen Triple Flask 500cm², Nunc
- Begasungsbrutschrank Typ BB 6060, Heraeus sepatech
- Begasungsbrutschrank Typ BB 6220, Heraeus sepatech
- Wasserbad, GFL
- Invers-Mikroskop Telaval 3, Carl Zeiss
- Laminarbox, Heraeus
- Fireboy, Schuett Phoenix
- Accu Jet® Pro, Brand
- CASY TTC, Schärfe System

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

- Mini ProteanR 3, Gelkammer, Bio-Rad
- Glasplatten mit integriertem Abstandshalter, Mini Protean R 3, Bio-Rad
- Novex Mini-Cell Gelkammer, Invitrogen
- NuPage 12 % Bis-Tris Gel, 1mm x 12 Well, Invitrogen
- Power Supply BRL ST 606T, Gibco
- Power Supply Model 1000/5000, Bio-Rad

Western Blot

- Westernblot Mini Trans Blot System, Bio-Rad
- Immun-Blot PVDF Membran 0,2 µm, Bio-Rad
- Filterpapier, Machery Nagel
- Power Supply BRL ST 606T, Gibco

Immunhistochemie

- Mikroskop Axioskop, Carl Zeiss
- Deckgläschen 24 x 24 mm, Menzel-Gläser

Indirekte Immunfluoreszenz

- LSM 510 Meta Mikroskop, Carl Zeiss
- LSM Image Browser, Zeiss

Boyden-Kammer Assays

- Matrigel Invasion Chambers (6 wells), BD BioCoat
- Control Inserts (6 wells), BD BioCoat
- Companion Plates (6 wells), BD BioCoat
- Objektträger, Menzel

Zentrifugen und Vortexer

- miniSpin Plus, Eppendorf
- Universal 30 RF, Hettich
- Rotina 35R, Hettich
- Biofuge Stratos, Heraeus sepatech
- Megafuge 1.0, Heraeus sepatech
- SpeedVac DNA 120, ThermoSavant

Schüttler und Rotatoren

- AKAI Direct Drive Turntable AP-A201
- Stuart Rotor SB2
- Thermomixer compact, Eppendorf
- Titramax 101, Heidolph
- Unitwist RT
- Vibramax VXR, IKA

Sonstige Geräte

- Binokular Stemi 2000C, Zeiss
- Waage BL 610, Sartorius
- Feinwaage BP 61, Sartorius
- DRI-Thermoblock, Techne
- Blockthermostat BT100, Kleinfeld
- NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer, peQLab Biotechnologie GmbH
- Ultraschallbad, Sonorex RK 31, Bandelin
- Timer, Carl Roth
- Purelab Maxima, Millipore
- Multical pH-Meter, WTW
- AP-30, Scotsman
- Image Scanner, Microtek
- Varioklav® Dampfsterilisator, H + P
- Kühl- und Gefrierschränke, Liebherr, Scandilux und Heraeus
- Magnetrührer, IKA und Heidolph
- Mikrowelle, Bosch
- Pipetten, Gilson und Eppendorf
- Reax 2000 Vortexer, Heidolph

Software

- Microsoft Excel
- LabImage 1D Version 4.1, Kapelan
- LSM 510 Meta, Version 3.2, Zeiss
- flexImagingTM 2.1, Bruker Daltonik
- Ciphergen Express Client 3.0, Ciphergen
- Feature Extraction vs. 10.5.1.1., Agilent Technologies
- Gene Spring GX v. 10.0.2, Agilent Technologies

2.2 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Allgemeine Chemikalien

Es wurden im Laboralltag gebräuchliche Chemikalien vom höchsten erhältlichen Reinheitsgrad verwendet. Sie stammten von den Firmen Fluka (Bruchs, Schweiz), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Sigma (Taufkirchen), Serva (Heidelberg) und Roche (Mannheim). Das verwendete Wasser wurde mit einer Reinstwasseranlage (Purelab Maxima, Millipore) gereinigt. Lösungen wurden, falls notwendig, 20 Minuten bei 121 °C autoklaviert oder sterilfiltriert.

Massenspektrometrie

- Sinapinsäure, 98 % titration, Sigma-Aldrich
- α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid, Sigma-Aldrich
- Peptide Calibration Standard, Bruker Daltonik
- Protein Calibration Standard, Bruker Daltonik
- Haemalaunlösung sauer nach Mayer, Dr. K. Hollbronn & Söhne
- Eosin, Sigma-Aldrich
- Microscopy Entellan Eindeckmedium, Merck

Immundepletion

- Protein A-Agarose, Sigma-Aldrich

Eukaryotische Zellen (*Homo sapiens*)

- HaCaT Keratinozyten
- FaDu Plattenepithelkarzinomzellen

Zellkultur

- 0,05 % Trypsin/ 0,02 % EDTA-Lösung, Biochrom AG
- CASY-Ton, Schärfe System
- Dimethylsulfoxid (DMSO), Sigma-Aldrich
- DMEM, PAN Biotech
- Fetales Kälberserum, Biochrom
- Hämacolor Schnelfärbung, Merck
- Kalziumchlorid, Sigma-Aldrich

SDS-Gelelektrophorese

- Precast Bis-Tris Gele, 10 % und 12 %, Invitrogen
- PageRuler (prestained), Fermentas
- PageRuler Plus (prestained), Fermentas
- Polyacrylamid 37,5 %, Serva

Western Blot

- BCIP, Carl Roth
- NBT, Carl Roth
- Milchpulver, fettarm, Tegut
- Tween-20, Sigma-Aldrich

Primäre Antikörper**Tabelle 1: Verwendete primäre Antikörper**

Detektiertes Antigen	Herkunft	Art des Antikörpers	Hersteller
anti-Defensin 1-3	Maus	monoklonal	BMA Biomedicals
anti-Defensin 1-3	<i>Maus</i>	monoklonal	Bachem
anti-Calgranulin A	Kaninchen	polyklonal	Santa Cruz
anti-MRP8 (S100A8)	Maus	monoklonal	BMA Biomedicals
anti-MRP14 (S100A9)	Maus	monoklonal	BMA Biomedicals
anti-S100A8/A9	Maus	monoklonal	Affinity Bioreagents
anti-S100A11	Kaninchen	polyklonal	Proteintech Group
anti-Ubiquitin	Kaninchen	polyklonal	DAKO
anti-Aktin	Kaninchen	polyklonal	Sigma
anti-Normal IgG	Kaninchen		Pepro Tech

Sekundäre Antikörper

- Anti Kaninchen-IgG-AP, Dianova
- Anti-Maus-IgG-AP, Santa Cruz
- Ziege-IgG-AP, Santa Cruz
- Maus-IgG-Cy3, Dianova
- Kaninchen-IgG-Cy3, Dianova

Immunhistochemie

- Dako REAL™ Detection Systems AP/RED, Kaninchen/Maus, Dako
- Dako REAL™ Antibody Diluent, Dako
- Avidin/Biotin Blocking Kit, Invitrogen
- Glycerol-Gelatine, Sigma-Aldrich

Immunfluoreszenz

- DNA-Farbstoff To-Pro-3-Iodid, Molecular Probes, Eugene, USA
- ProLong Gold Antifade Mounting Medium, Invitrogen
- Deckgläser (15 mm, rund), Carl Roth
- Superfrost Objektträger, Menzel

Boyden Kammer Assays

- Chemoattractant (FCS), Biochrom
- Hemacolor Schnellfärbung, Merck
- Immersionsöl, Zeiss

Plasmid-Präparation und Agarose-Gelelektrophorese

- Hygromycin B, Sigma-Aldrich
- Sea Kem Agarose, Biozym
- GelStar Nucleic Acid Gel Stain 10.000 x in DMSO, Biozym
- DNA loading Dye (6 x Mass Ruler), Qiagen
- Zippy™ Plasmid Miniprep Kit, Zymo Research
- Plasmid Midi Kit, Qiagen

Transfektionsreagenzien

- TurboFect in vitro Transfection Reagent, Fermentas
- SAINT-Mix DNA Delivery System, Synvolux

Sonstige Verbrauchsmittel

- 6-well Kulturplatten, Greiner
- CASY-Röhrchen (CASY cups), Schärfe System
- Falconröhrchen, 15 ml und 50 ml, Greiner
- Kryoröhrchen, Greiner
- Petrischalen, verschiedene Größen, Greiner
- Pipettenspitzen, verschiedene Ausführungen, Gilson, Greiner, Biozym
- Reaktionsgefäße, verschiedene Größen, Eppendorf, Biozym
- Sterile Einmalpipetten, 5 ml und 20 ml, Greiner

3 Methoden

3.1 Massenspektrometrische Methoden

3.1.1 Probenpräparation

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Patientenproben stammten aus der Klinik für Hals-Nasen- und Ohrenkrankheiten des Universitätsklinikums Jena. Die Tumorproben wurden chirurgisch vom Patienten entfernt, in Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert. Alle Patientenproben wurden nach WHO-Kriterien klassifiziert und die ethische Approbation erfolgte vom örtlichen Ethik-Komitee.

3.1.2 Matrix assisted laser desorption/ionization (MALDI) imaging mass spectrometry (IMS)

Vorbereitend für die MALDI-IMS-Analyse wurden 10 µm dicke Gefrierschnitte von Geweben auf einem Kryostat angefertigt und auf einen vorgekühlten Zink-Oxid-(ITO-)MALDI-Objektträger aufgetragen. Das Gewebe wurde anschließend 2 x 30 sec in 70 % Ethanol und 1 x 20 sec in 100 % Ethanol fixiert und in einem Exsikkator trocknen gelassen. Es folgte die Applikation der Matrix. Dafür wurden 10 mg/ml Sinapinsäure in 60 % Azetonitril und 40 % 0,3 % TFA in Wasser gelöst und mit Hilfe des ImagePrep (Bruker Daltonik) nach Angaben des Herstellers aufgetragen.

Die MALDI-Messung erfolgte in einem Ultraflex III TOF/TOF (Bruker Daltonik) ausgestattet mit einem 200 Hz smartbeam laser. Die Messung erfolgte im linearen Modus in einem Massenbereich von 2000 Da bis 25000 Da mit einer sampling rate von 0,10GS/s. Die räumliche Auflösung wurde auf 50 µm festgesetzt.

Die Auswertung der MALDI-Daten erfolgte mit der flexImaging™2.1 Software (Bruker Daltonik).

Nach der MALDI-IMS Messung wurde die Matrix vom Gewebe mit 70 % Ethanol abgewaschen und eine konventionelle Hämatoxylin-Eosin-Färbung folgte. Dafür wurde der trockene Gewebeschnitt für 15 min in Hämaunlösung gefärbt. Anschließend erfolgte das Bläuen der Kerne unter Leitungswasser für 10 min. Um das Zytoplasma des Gewebes rot anzufärben, wurde der Schnitt für 20 sec in Eosin gegengefärbt. In einer aufsteigenden Alkoholreihe wurde das Gewebe dehydriert und in einem Xylohaltigen Eindeckmedium mit einem Deckgläschen beschichtet. Das gefärbte Gewebe wurde anschließend fotografiert und das Bild mit der flexImaging™2.1 Software ko-registriert. Die MALDI-IMS Ergebnisse wurden zusammen mit einem erfahrenen Pathologen ausgewertet.

3.1.3 Mikrodisektion und SELDI-TOF-MS

Mittels Mikrodisektion ist es möglich spezifische Bereiche aus einem Gewebeschnitt herauszuschneiden und diese mittels SELDI-TOF-MS (*surface enhanced laser desorption/ionisation time of flight mass spectrometry*) separat zu analysieren.

Vorbereitend dafür wurden mit einem Kryostaten 10 µm dünne Gewebeschnitte hergestellt und auf einen spezifischen, mit einer 1,35 µm dicken Polyethylen-Naphtalat-Membran beschichteten PALM Objektträger transferiert. Auf diesem nativen Gewebeschnitt wurden unter dem LMPC (laser microdissection and pressure catapulting microscope; PALM) spezifische Bereiche angezeichnet und mittels eines Lasers ausgeschnitten. Die spezifischen ausgeschnittenen Bereiche wurden direkt auf einen vorher aktivierten CM10 ProteinChip übertragen. Für die Aktivierung dieses

Kationenaustauschers wurden 2 x 5 µl CM10-Puffer aufgetragen und in einer feuchten Kammer jeweils 5 min inkubiert. Anschließend wurde der Puffer entfernt und durch 5 µl Lysepuffer ersetzt. Das mikrodissoziierte Gewebestückchen wurde direkt in den Lysepuffer transferiert. Die Lyse des Schnittes erfolgte für 90 min in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur. Ungebundenes Material und Puffersalze wurden durch zweimaliges Waschen mit CM10-Puffer sowie Wasser entfernt und der ProteinChip wurde lufttrocknen gelassen. Nach Auftragen und Eintrocknen der Matrix (gesättigte Sinapinsäure in 0,5 % TFA/50 % Azetonitril) erfolgte die Massenanalyse im ProteinChip Reader nach einem automatischen Protokoll.

CM10-Puffer: 0,1 M Natriumacetat, pH 4,0

Lysepuffer: 970 µl Lysepuffer D (0,1 M Na-Phosphat + 2 mM MgCl₂ + 5 mM EDTA)
10 µl 50 mM Leupeptin
10 µl 10 mM PMSF
10 µl 10 %iges CHAPS
0,21 µl 2-β-Mercaptoethanol

3.1.4 Immundepletion/ Immuncapturing

Mittels einer Immundepletion ist es möglich, ein spezifisches Protein aus einem Gemisch vieler verschiedener Proteine heraus zu filtern. Dabei wird ein spezifischer Antikörper an Protein-A gekoppelte Agarose-Beads gebunden und mit zu untersuchendem Zelllysats inkubiert. Anschließend wird die Depletion mittels SELDI-MS nachgewiesen. Beim Immuncapturing wird das Protein über einen spezifischen Antikörper aus dem Zelllysats präzipitiert. Auch hier erfolgt die Analyse mittels SELDI-MS.

Für die Immundepletion/ Immuncapturing wurden ca. 10 µl Protein-A Agarose in ein Reaktionsgefäß überführt und gründlich mit Co-IP-Puffer gewaschen. Es folgte die Zugabe eines spezifischen Antikörpers (200 µg/ml), der 30 min auf Eis inkubiert wurde. Dabei erfolgte alle 10 min eine Durchmischung der Agarose Beads mit dem Antikörper. Freie Bindungsstellen der Protein-A Agarose wurden anschließend für 30 min in einer 3 %igen Milchpulverlösung blockiert. Vor der Zugabe des Zelllysats musste die Agarose mehrfach in Co-IP-Puffer gewaschen werden, um ungebundenen Antikörper und die Blockierungslösung vollständig von den Beads zu entfernen. Auf 10 µl Agarose wurden mindestens 100 µl Lysat gegeben und für 1 h auf Eis inkubiert. Auch hier erfolgte alle 10 min eine Durchmischung der Agarose. Für die Immundepletion wurde der Überstand abgenommen und 5 µl auf einen mit Q10-Puffer equilibrierten Q10-Chip aufgetragen. Für das Immuncapturing wurde der restliche Überstand verworfen und die Beads mit Co-IP-Puffer gewaschen. Die Elution der gebundenen Proteine von den Agarose-Beads erfolgte mit 30 µl Elutionspuffer (50 % ACN, 0,5 % TFA) für 15 min bei leichtem Schütteln. 5 µl des Eluates wurden ebenfalls auf einen equilibrierten Q10-Chip aufgetragen. Die Ansätze wurden für 2 h in einer feuchten Kammer inkubiert. Durch mehrmaliges Waschen mit Q10-Puffer und Wasser wurden ungebundene Bestandteile vom Protein-Chip entfernt. Nach Auftragen der Matrix erfolgte die Analyse im SELDI-MS.

Co-IP-Puffer: 20 mM HEPES
0,1 mM EDTA
50 mM KCl
0,05 % CHAPS

3.2 Arbeiten mit eukaryotischen Zellen

Für das Arbeiten mit eukaryotischen Zellen wurden ausschließlich sterile Puffer, Medien, Zentrifugenröhrchen und Einmal-Pipetten verwendet. Die Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen unter einer Laminarbox durchgeführt.

3.2.1 Verwendete Zelllinien

In den Experimenten wurden HaCaT-Keratinocyten sowie FaDu-Kopf-Hals-Tumor-Zellen verwendet.

HaCaT-Keratinocyten sind humane epitheliale, immortalisierte Zellen, die nicht als Tumorzellen eingestuft werden [Boukamp et al. 1988]. Die Zellen stammen aus einem primären malignen Melanom, welches im oberen Bereich der Rückenhaut lokalisiert war. Im Vergleich zu nativen Keratinocyten dient die HaCaT-Zelllinie als stabiles Modellsystem für Epidermiszellen.

FaDu-Zellen sind Plattenepithelzellen, die aus einer Stanz-Biopsie eines Hypopharyngeal-Tumors stammen. Die Zelllinie wurde 1968 angelegt und enthält Tonofilamente im Zell-Zytoplasma und typische desmosomale Regionen an Zell-Grenzen [Rangan 1972].

3.2.2 Zellkultur eukaryotischer Zellen

Die Kultivierung der in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien erfolgte in DMEM mit einem Zusatz von 10 % fetalem Kälberserum (FCS) bei 37 °C und 5 % CO₂ in Gewebekulturflaschen. Sobald sich ein konfluenter Monolayer (70 – 80 %) gebildet hatte, wurden die Zellen passagiert. Dazu wurde das in der Gewebekulturflasche befindliche Medium vorsichtig abgesaugt und die adhärent wachsenden Zellen wurden mit sterilem PBS gewaschen, um restliches Medium und tote Zellen zu entfernen. Nach Absaugen des PBS wurden die Zellen mit einer sterilen 0,05 %igen EDTA-Lösung behandelt, um bestehende Desmosomen zwischen den Zellen aufzulösen. Um die Zellen vollständig vom Flaschenboden zu lösen, wurden diese mit einer Trypsin/EDTA-Lösung benetzt und für einige Minuten bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Sobald sich die Zellen vom Flaschenboden gelöst haben, wurde die proteolytische Reaktion des Trypsins mittels Zugabe von frischem Medium gestoppt und die Zellsuspension in ein steriles Zentrifugenröhrchen transferiert. Abhängig von der Größe der Gewebekulturflasche wurden erneut 0,5 ml bis 4 ml der geernteten Zellen in die Kulturflasche überführt, mit frischem Medium aufgefüllt und wie beschrieben kultiviert.

Die verbleibende Zellsuspension wurde abhängig von der weiteren Versuchsdurchführung pelletiert und in Stickstoff schockgefroren oder ausgezählt und erneut ausgesät.

Für das Pelletieren der Zellen wurde die Suspension für 5 min bei 1500 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und das Zellpellet in 1 ml PBS resuspendiert, um Reste des Mediums vollständig zu entfernen. Anschließend wurde die Suspension erneut zentrifugiert und das Pellet in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C aufbewahrt.

3.2.3 Bestimmung der Zellzahl mittels Trypanblau

Die Anzahl und Viabilität von Zellen wurde mit einer Neubauer-Zählkammer nach Anfärben der Zellen mittels Trypanblau bestimmt. Der Farbstoff dringt durch die poröse Membran toter Zellen in das Zytoplasma ein und färbt diese Zellen blau, während lebende Zellen diesen Farbstoff nicht aufnehmen können und somit farblos bleiben. Somit kann man unter dem Mikroskop tote von lebenden Zellen unterscheiden. Für die Auszählung der lebenden Zellen in einer Zellsuspension

wurden 20 µl 1:1 mit einer 0,5 %igen Trypanblau-Lösung versetzt und 5 min bei 37 °C inkubiert. In der Neubauer-Zählkammer wurden zweimal vier Großquadrate ausgezählt und der Mittelwert gebildet.

3.2.4 Bestimmung der Zellzahl mittels CASY

Eine weitere Methode zur Bestimmung der Zellzahl ist die automatische Zellzählung mit dem CASY-System. Dieses beruht auf dem Prinzip der elektrischen Pulsflächenanalyse. Zur Messung werden die Zellen in einer Elektrolytlösung resuspendiert und mit konstanter Strömungsgeschwindigkeit durch die Kapillare gesaugt. Während der Messung wird über zwei Elektroden eine Spannung an die Kapillarstrecke angelegt und der Widerstand gemessen. Durch dieses Verfahren können Zellzahl, Zellvolumen, Zellgrößenverteilung sowie Vitalität mit großer Genauigkeit gemessen werden. Für die CASY-Messung wurden 50 µl Zellsuspension in 10 ml CASY-Ton-Puffer verdünnt. Um die Anzahl lebender Zellen zu bestimmen, wurde die Zellzahl in einem Größenbereich von 7,5 µm bis 25 µm Zelldurchmesser ermittelt.

3.2.5 Stimulation der S100A8-Expression

Um die Expression der Kalzium-bindenden Proteine S100A8 und S100A9 zu stimulieren, wurden eukaryotische Zellen mit CaCl₂ behandelt. Die Behandlung erfolgte mit 5 mM CaCl₂ für 24 h. Anschließend wurde das CaCl₂-haltige Medium abgenommen und die Zellen für die Immunfluoreszenz fixiert oder für die weitere Verwendung geerntet.

3.3 Arbeiten mit Proteinen

3.3.1 Herstellung von Zelllysaten

Mittels Trypsin-Behandlung geerntete Zellen wurden durch Zentrifugation (5 min, 1500 rpm) pelletiert, einmal mit PBS gewaschen und in Stickstoff schockgefroren. Das Zellpellet wurde auf Eis aufgetaut, 1:3 mit Lysepuffer versetzt, resuspendiert und für 30 min auf Eis lysiert. Durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren der Suspension wurden die Zellmembranen mechanisch aufgebrochen und so die Lyse unterstützt. Durch 15 minütige Zentrifugation bei 15000 rpm und 4 °C setzten sich die verbleibenden Zelltrümmer als Pellet am Boden ab, so dass sich lösliche Proteine im Überstand befanden. Dieser wurde abgenommen, in neue Reaktionsgefäße überführt und die Proteinkonzentration photometrisch bestimmt. Dazu wurden 5 µl des Lysats gegen Wasser bei OD₂₈₀ auf dem Nanodrop gemessen.

Lysepuffer: 970 µl Lysepuffer D (0,1 M Na-Phosphat + 2 mM MgCl₂ + 5 mM EDTA)
10 µl 50 mM Leupeptin
10 µl 10 mM PMSF
10 µl 10 %iges CHAPS

3.3.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Mit Hilfe der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) werden Proteinkomplexe entsprechend ihres Molekulargewichtes elektrophoretisch nach dem Puffersystem von Laemmli [Laemmli 1970] separiert.

SDS (Sodium dodecyl sulfate) ist ein anionisches Detergenz, das Proteine denaturiert und dessen Eigenladung vollständig überdeckt. Dadurch erlangen die Proteine eine einheitlich negative Ladung,

so dass das Laufverhalten im SDS-Gel nur noch von der Molekulargröße der Proteine abhängt. Je nach Proteingröße benutzt man verschieden vernetzte Trenngele.

Zunächst wurde ein 10 oder 12 %iges Trenngel (w/v) gegossen und mit 0,1 % SDS überschichtet, damit sich eine planare Oberfläche bilden kann. Nach dem Auspolymerisieren des Trenngels wurde das SDS vollständig entfernt, die 5 %ige Sammelgel-Lösung auf das Trenngel gegossen und ein Probenkamm luftblasenfrei eingesetzt. Nachdem auch das Sammelgel vollständig auspolymerisiert war, wurde der Probenkamm vorsichtig entfernt und das Gel in eine vertikale Gelapparatur eingesetzt. Die Probestaschen wurden mit Laufpuffer gespült und die Gelkammer mit Laufpuffer aufgefüllt. Die lysierten Proteinproben wurden 1:2 mit 4 x SDS-Auftragspuffer versetzt, 5 min bei 95 °C denaturiert und anschließend in die Geltaschen pipettiert. Zusätzlich wurde ein Protein-Standard, der Proteine bekannter Größe enthält, mitgeführt. Die Proteine wurden elektrophoretisch bei 180 V und maximal 500 mA in einfachem Laemmli-Laufpuffer aufgetrennt.

Für die Separierung von Proteinen mit ähnlichen Molekulargewichten wurden kommerziell erhältliche Bis-Tris-Gele (Invitrogen) verwendet. Diese Gele ermöglichen sehr hohe Trennschärfen auch bei Proteinen mit kleineren Molekulargewichten. Die Auftrennung der Proteine erfolgte im MES- beziehungsweise MOPS-Puffer, je nach aufzutrennendem Molekulargewichtsbereich, bei 200 V in einer Invitrogen-Kammer.

Trenngel (10 %):	4 ml ddH ₂ O 3,3 ml 30 % Acrylamid 2,5 ml 1,5 M Tris pH 8,8 0,1 ml 10 % SDS 0,1 ml 10 APS 0,004 ml TEMED
Sammelgel (5 %):	2,7 ml ddH ₂ O 0,67 ml 30 % Acrylamid 0,5 ml 1 M Tris pH 6,8 0,04 ml 10 %SDS 0,04 ml 10 %APS 0,004 ml TEMED
4 x SDS-Auftragspuffer:	40 mM Tris-HCl 4 % SDS 10 % β-Mercaptoethanol 40 % Glycerin 0,002 % Bromphenolblau
1 x Laemmli-Laufpuffer:	25 mM Tris-HCl, pH 8,3 250 mM Glycerin 0,1 % SDS
10 x MOPS-Laufpuffer:	500 mM MOPS 500 mM Tris 1 % SDS 10 mM EDTA, pH 7,7

10 x MES-Laufpuffer: 500 mM MES
500 mM Tris
1 %SDS
10 mM EDTA, pH 7,3

3.3.3 Western Blot

Mit Hilfe des Western Blots können Proteine aus einem SDS-Polyacrylamidgel auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF) -Membran transferiert werden. Durch diese Immobilisierung der Proteine auf der Oberfläche können immunologische Nachweise durchgeführt werden [Towbin et al. 1979].

Die hydrophobe PVDF-Membran ist mechanisch und chemisch stabil. Sie eignet sich unter anderem für Immunfärbungen und Aminosäuresequenzierungen. Wässrige Lösungen benetzen die hydrophobe Membran nicht, weswegen diese vor dem Transfer in Methanol geschwenkt werden muss [Gultekin et al. 1988].

Der Transfer der Proteine erfolgte bei 150 mA pro Gel im Transferpuffer für 1,5 h bei 4 °C. Zur Vermeidung von unspezifischen Antikörperbindungen wurde die Membran unter ständigem Schwenken für 30 min in einer 2%igen Milchpulverlösung geblockt. Die Membran wurde anschließend zweimal 10 min in 1 x TBS-T-Puffer und einmal 10 min in 1 x TBS-Puffer gewaschen. Es folgte die Inkubation mit dem entsprechenden primären Antikörper über Nacht bei 4 °C. Ungebundener Antikörper wurde durch erneutes Waschen in TBS-T- und TBS-Puffer entfernt. Es folgte die 2 stündige Inkubation mit einem speziesspezifischen, alkalische-Phosphatase-gekoppelten Sekundärantikörper. Nicht gebundener Antikörper wurde erneut durch Waschen mit TBS-T- und TBS-Puffer (jeweils 10 min) entfernt. Die Visualisierung der Antigen-Antikörper-Komplexe erfolgte mittels Alkalischer-Phosphatase-Reaktion (AP). Es wurden 20 ml des AP-Puffers mit 132 µl Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (NBT) und 66 µl 5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat (BCIP) inkubiert. Die enzymatische Farbreaktion wurde durch die Zugabe von 1 x PBS gestoppt. Die entwickelten und anschließend getrockneten Western Blots wurden eingescannt und ausgewertet.

Transferpuffer:	100 mM Tris-HCl 767 mM Glycin 20 % Methanol	AP-Puffer:	100 mM NaCl 5 mM MgCl ₂ 100 mM Tris, pH 9,5
10 x TBS-T:	250 mM Tris, pH 7,5 1,37 M NaCl 27 mM KCl 0,5 % Tween-20	10 x TBS:	250 mM Tris-HCl, pH 7,5 1,37 mM NaCl 27 mM KCl

Primäre Antikörperlösung (10 ml): 9,5 ml 1 x PBS
0,5 ml fetales Kälberserum (FCS)
25 µl Natriumazid
x µl Antikörper (je nach Verdünnungsfaktor)

Sekundäre Antikörperlösung: 50 mM Tris-HCl, pH 7,5
150 mM NaCl
x µl Antikörper (je nach Verdünnungsfaktor)

BCIP: 0,5 g BCIP in 10 ml 100 % Dimethylformamid

NBT: 0,5 g NBT in 10 ml 70 % Dimethylformamid

3.3.4 Immunpräzipitation mittels IDM Affinity Beads

Mit Hilfe einer Immunpräzipitation ist es möglich ein spezifisches Protein mit seinen Interaktionspartnern aus einer Vielzahl von Proteinen in Lösung zu isolieren. Dafür wird Protein A, ein Protein aus der Zellwand von *Staphylococcus aureus*, an IDM Affinity Beads gekoppelt. Ein spezifischer Antikörper bindet über den Fc-Teil an Protein A.

Für eine Immunpräzipitation wurden 100 µl IDM Affinity Beads in ein Reaktionsgefäß überführt und mehrfach mit Aqua dest. gewaschen. Anschließend wurden die Beads mit 200 µl Protein A-Lösung (4 mg/ml Protein A in 50 mM Natriumacetat-Puffer pH 5,0) auf einem Überkopf-Rotor über Nacht bei 4 °C inkubiert. Um ungebundenes Protein A zu entfernen, wurden die Beads mit Natriumacetat-Puffer gewaschen. Es folgte die 2 stündige Aktivierung von Protein A in 500 µl 0,5 M Tris/HCl pH 9,0, 0,1 % Triton X-100. Der Puffer wurde durch 3 maliges Waschen mit PBS vollständig entfernt. Es folgte die Zugabe des spezifischen Antikörpers (2 µg pro 5 µl Beads in 400 µl 50 mM Natriumacetatpuffer pH 5,0). Als Negativkontrolle diente ein unspezifischer Antikörper aus Kaninchen. Die Kopplung des Antikörpers an die mit Protein A beladenen Beads erfolgte im Überkopf-Rotor bei 4 °C über Nacht. Nach einem Waschschrift mit Natriumacetatpuffer und einem mit PBS wurden die Beads mit 100 µl Zelllysate pro 5 µl Affinitätsmatrix bei 4 °C für 2 Stunden inkubiert. Um alle ungebundenen und unspezifisch gebundenen Proteine zu entfernen, wurden die Beads zuerst in 500 µl PBS gewaschen. Es folgte ein stringenter Waschschrift in 0,5 M NaCl, Triton X-100. Abschließend wurden die Beads erneut mit PBS gewaschen. Die Elution der gebundenen Proteinkomplexe erfolgte mit Elutionspuffer (50 % ACN, 0,5 % TFA, 10 µl Puffer je 5 µl Affinitätsmatrix). Die Elution erfolgte für 15 min bei leichtem Schütteln. Abschließend wurden die Eluate elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert.

3.3.5 Co-Immunpräzipitation mittels Protein-A-Agarose

Die Co-Immunpräzipitation dient der Verifizierung von Protein-Protein-Interaktionen. Dabei können Proteine, die mit dem präzipitierten Antigen interagieren und einen Komplex bilden, spezifisch aus dem Proteinextrakt isoliert werden. Es folgt eine elektrophoretische Separierung der Proteinkomplexe, die anschließend im Western Blot nachgewiesen werden.

Für jeden Reaktionsansatz wurden 20 µl Protein A-Agarose-Beads in ein Reaktionsgefäß überführt und gründlich mit Co-IP-Puffer gewaschen. Es folgte die Zugabe des spezifischen Antikörpers (200 µg/ml). Dieser wurde für 30 Minuten auf Eis inkubiert, wobei alle 10 Minuten die Agarose durchmischt wurde. Freie Bindungsstellen der Protein A-Agarose wurden mit einer 3 %igen Milchpulverlösung für 30 Minuten auf Eis blockiert. Um die gesamte Blockierlösung zu entfernen wurden die Beads mehrfach mit Co-IP-Puffer gewaschen. Anschließend wurden auf 10 µl Agarose mindestens 100 µl Zelllysate zugegeben, welches für 1 Stunde auf Eis inkubiert wurde. Auch hier wurden die Beads alle 10 Minuten durchmischt. Der Überstand wurde abgenommen und die Agarose-Beads erneut mehrfach mit Co-IP-Puffer gewaschen. Die Elution der gebundenen Proteinkomplexe von den Beads erfolgte mit SDS-Auftragspuffer durch 5 minütige Inkubation bei 95 °C. Anschließend wurden die Proteinkomplexe der Größe nach im SDS-Gel aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Als Negativkontrolle diente ein unspezifischer IgG-Antikörper aus Kaninchen.

Co-IP-Puffer: 20 nM HEPES
0,1 mM EDTA
50 mM KCl
0,05 % CHAPS

3.3.6 Immunhistochemie

Die Immunhistochemie ermöglicht es, Proteine mittels Antikörpern im Gewebe sichtbar zu machen und die exakte Lokalisation dieser zu bestimmen. Die Durchführung erfolgte mit dem Dako REAL™ Detection Systems AP/RED, Kaninchen/Maus.

Vorbereitend für die Immunhistochemie wurden mit einem Kryostat Gewebeschnitte mit einer Stärke von 10 µm hergestellt. Die Schnitte wurden anschließend für 20 sec mit Methanol und 9 min mit eiskaltem Aceton fixiert und an der Luft trocknen gelassen.

An den fixierten Schnitten erfolgte die Avidin-Biotin-Blockierung. Dafür wurden 2 Tropfen Avidinlösung auf den Schnitt aufgetragen und in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur für 10 min inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit TBS-T-Puffer wurden 2 Tropfen Biotinlösung auf den Schnitt gegeben und ebenfalls für 10 min inkubiert. Die restliche Blockierungslösung wurde durch einen Waschschrift mit TBS-T entfernt. Es folgte die Inkubation mit dem Primärantikörper. Dafür wurden 100 µl des verdünnten spezifischen primären Antikörpers auf den Schnitt aufgetragen und 1 h bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert. Nicht gebundener Antikörper wurde durch Waschen mit TBS-T entfernt. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper, der gebrauchsfertig dem Kit beiliegt. Es wurden 2 Tropfen der Antikörperlösung auf den Schnitt aufgetragen und 30 min in einer feuchten Kammer inkubiert. Ungebundener Antikörper wurde durch mehrmaliges Waschen mit TBS-T entfernt. Es folgte die Zugabe (30 min, Raumtemperatur) einiger Tropfen Streptavidin, das spezifisch an den Sekundärantikörper bindet. Dieses wurde anschließend erneut durch mehrmaliges Waschen mit TBS-T entfernt. Anschließend wurde der Substratkomplex bestehend aus Puffer, Levamisol und Chromogen auf den Schnitt aufgetragen und für 15 min inkubiert. Dieser Komplex bindet an die Verbindung aus primärem Antikörper, sekundären Antikörper und Streptavidin und führt zu einer spezifisch roten Färbung an den Stellen des Gewebeschnittes, an dem der Primärantikörper gebunden hat. Durch Waschen mit TBS-T wird ungebundener Substratkomplex entfernt. Es folgte die Gegenfärbung mit Hämatoxylin (1 min) und anschließend das Bläuen der Zellkerne unter Leitungswasser für 10 min. Die noch feuchten Schnitte wurden mit vorgewärmter Glycerol-Gelatine eingedeckt und an der Luft trocknen gelassen. Die Auswertung der immunhistochemischen Färbung erfolgte unter dem Mikroskop.

10 x TBS-T: 250 mM Tris, pH 7,5
1,37 M NaCl
27 mM KCl
0,5 % Tween-20

3.4 Zellbiologische Arbeiten

3.4.1 Transfektion von siRNA

RNA-Interferenz (RNAi) ist ein Mechanismus der Genregulation, der zum Abschalten von Genen in der Zelle führt. Doppelsträngige RNA wird in kürzere siRNA (*small interfering RNA*) zerlegt und durch den RISC-Komplex (*RNA induced silencing complex*) gebunden. Dieser ermöglicht die Interaktion zwischen siRNA und der Ziel-mRNA. Dies führt zur Degradation der Ziel-mRNA und somit zum Stummschalten des entsprechenden Gens [Tuschl et al. 2002, Behlke 2006]. Dieser Mechanismus ist reversibel, weshalb man von einem *knock-down* spricht.

Die Transfektion von siRNA in eukaryotische Zellen erfolgte mit Hilfe des Saint-Red Transfektionsreagenz (Synvolux), dessen Funktionsweise auf der synthetischen amphiphilvermittelten Transfektion von RNA in Zellen basiert.

Pro well einer 6-well-Kulturschale wurden $1,0 \times 10^5$ HaCaT-Zellen ausgesät und über Nacht im Brutschrank kultiviert. Für einen Transfektionsansatz wurden 6 µl (50 nM) siRNA und 12 µl HBS, sowie 20 µl Saint-Red und 80 µl HBS vermischt und 5 min bei RT inkubiert. Die Ansätze wurden vereinigt und innerhalb von 15 min zu den Zellen gegeben. Zusätzlich wurden in jedes well 800 µl frisches DMEM-Medium zugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 4 h im Brutschrank wurde den Zellen erneut 2 ml Medium zugegeben. Nach 72 h erfolgte eine Nachtransfektion. 7 Tage nach der ersten Transfektion wurden die Zellen geerntet.

3.4.2 Indirekte Immunfluoreszenz

Mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz ist es möglich, Proteine in der Zelle in räumlicher und zeitlicher Abhängigkeit zu detektieren. Dazu nutzt man spezifische Antikörper als Sonden, an denen Fluoreszenzfarbstoffe (Fluorochrome) gekoppelt sind.

Vorbereitend für die Immunfluoreszenz wurden Zellen auf Deckgläschen ausgesät und für 24 h bei 37 °C kultiviert. Anschließend wurde das Medium abgesaugt, die auf den Deckgläschen adhärennten Zellen dreimal in 1 x PBS gewaschen und für 10 min in eiskaltem Methanol fixiert. Die Permeabilisierung der Zellen erfolgte für 3 min in eiskaltem Aceton. Dieses wurde durch dreimaliges Waschen in 1 x PBS entfernt.

Für die Immunfärbung wurden die fixierten Zellen mit einem in 1 x PBS entsprechend verdünnten primären Antikörpern in einer feuchten Kammer für 45 min inkubiert. Die jeweils passenden Verdünnungen der Antikörper wurden in Vorversuchen ermittelt. Nicht gebundener Antikörper wurde durch dreimaliges Waschen in 1 x PBS für jeweils 5 min entfernt. Es erfolgte eine 45 minütige Inkubation mit dem sekundären speziesspezifischen Antikörper (1:200 in 1 x PBS verdünnt). Auch nach diesem Schritt wurde ungebundener Antikörper durch dreimaliges Waschen mit 1 x PBS für jeweils 5 min entfernt. Zur Färbung der DNA wurden die Zellen für 10 min mit dem DNA-Farbstoff ToPro3 (1:500 verdünnt) inkubiert. Zur Stabilisierung der Fluorochrome wurden die Deckgläschen auf einem Objektträger mit einem Tropfen ProLong-Gold-Mounting-Medium (Invitrogen) eingebettet. Nach 24 h war das Mounting-Medium bei Raumtemperatur im Dunkeln auspolymerisiert und die Präparate wurden bis zur mikroskopischen Auswertung bei -20 °C aufbewahrt.

3.4.3 Invasions- und Migrationsassays mittels Boyden-Kammer

Der Test auf das Migrations- und Invasionspotential von Zellen wurde mittels Boyden-Kammern durchgeführt. Diese bestehen aus zwei Kompartimenten, die durch einen Filter und beim Invasionsassay zusätzlich durch ein Matrigel getrennt sind. Dieses wirkt als Basalmembranäquivalent, welches die Zellen durch invasives Wachstum durchwandern können. Der Assay beruht auf Chemotaxis, als Chemoattraktans dient Fetales Kälberserum (FCS), was in das untere Kompartiment der Kammern gefüllt wird.

Für den Boyden-Kammer-Assay wurden die Kammern zunächst mit Kulturmedium ohne FCS für 2 h bei 37 °C rehydriert. In dieser Zeit wurden die Zellen geerntet und mit dem CASY ausgezählt. Sowohl für den Migrations- als auch für den Invasionsassay wurden $1,25 \times 10^5$ Zellen eingesetzt.

In den rehydrierten Boyden-Kammern wurde das Medium entfernt. In das untere Kompartiment wurden 2 ml DMEM-Kulturmedium mit 20 %FCS gefüllt. Anschließend wurde das obere Kompartiment zusammen mit dem Filter luftblasenfrei aufgesetzt und 2 ml Zellsuspension eingefüllt. Der Ansatz wurde für 22 h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Während dieser Zeit wandern die Zellen durch das Matrigel bzw. den Filter.

Für die anschließende Färbung der gewanderten Zellen wurden die Kammern auseinandergebaut und die restliche Zellsuspension verworfen. Mit einem fusselfreien Tuch wurde die Filteroberseite vorsichtig abgewischt, um nicht gewanderte Zellen zu entfernen. Die auf der Filterunterseite sich befindlichen Zellen wurden zunächst fixiert und mit einer Hemacolor Schnellfärbung (Merck) gefärbt. Die Filter wurden mit Immersionsöl auf einen Objektträger aufgebracht und die invasiven Zellen unter dem Mikroskop ausgezählt.

3.4.4 Scratch-Assay

Mit Hilfe des Scratch-Assays werden Zellen hinsichtlich ihres Migrationspotentials *in vivo* untersucht. Dafür wurden sowohl HaCaT-Keratinocyten als auch FaDu-HNC-Zellen in 6-wells ausgesät und mit einem spezifischen S100A8-Plasmid transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurde mit einer sterilen 1 ml Pipettenspitze ein Scratch in den konfluenten Zellrasen gesetzt. Die anschließende Migration der Zellen über dieses nun unbewachsene Areal wurde über 7 Tage hinweg beobachtet und fotografiert.

3.4.5 Colony Forming Assay

Um die Überlebensrate von S100A8/A9-transfizierten Zellen mit den Zellen die kein S100A8/A9 tragen zu vergleichen, wurde ein *colony forming assay* durchgeführt. Dazu wurden sowohl HaCaT-Keratinocyten als auch FaDu-Zellen mit pVITRO-S100A8/A9 transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden 1000 Zellen in Kulturschalen mit einem Durchmesser von 10 cm ausgesät. Die Kulturen wurden anschließend bei 37 °C im Brutschrank kultiviert, bis sich im Mikroskop deutlich erkennbare Kolonien gebildet haben. Während dieser Zeit wurde das Medium alle drei Tage gewechselt. Als Kontrolle wurden Zellen mit einem unspezifischen gfp-Plasmid transfiziert.

Zur Auswertung wurden die Zellen einmal in PBS gewaschen und mit -20 °C kaltem Methanol für 15 min bei Raumtemperatur fixiert. Nach zweimaligem Waschen wurden die Zellen mit Hämacolor für 10 min gefärbt. Die Färbelösung wurde abgenommen und die Kulturschalen über Kopf vollständig

getrocknet. Die rot angefärbten Zellkolonien wurden mit dem Scanner aufgenommen und anschließend ausgezählt.

3.5 Arbeiten mit DNA und RNA

3.5.1 Plasmid-Transformation in kompetente Zellen

Das Plasmid pVITRO-S100A8/A9 wurde von Claus Kerkhoff (Münster) zur Verfügung gestellt. Um das Plasmid vom Filterpapier zu lösen wurde das Papier in kleine Stücke geschnitten und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Das Plasmid wurde durch Zugabe von ca. 150 µl TE-Puffer bei 37 °C für 15 min vom Filterpapier gelöst. Anschließend wurde die DNA-Konzentration photometrisch am NanoDrop bei OD₂₆₀ gegen Wasser bestimmt.

Für die Transformation der Plasmid-DNA in prokaryotische kompetente Zellen wurden 200 µl kompetente Bakterienzellen (*Escherichia coli* HB 101) auf Eis aufgetaut und 1 ng bis 100 ng Plasmid-DNA zugegeben. Der Ansatz wurde für 30 min auf Eis inkubiert, um durch einen anschließenden Hitzeschock (2 min, 37 °C) die Membranen der Bakterienzellen porös zu machen, so dass durch diese Poren die Plasmid-DNA in die Bakterienzellen gelangen können. Anschließend wurde dem Ansatz 1 ml kaltes LB-Medium zugegeben. Es folgte eine Kultivierung bei 37 °C für eine Stunde. Abschließend wurden die transformierten Bakterien auf vorgewärmten LB-Agar-Platten mit entsprechender Resistenz ausplattiert und über Nacht bei 37 °C kultiviert.

Für eine folgende Minipräparation wurden Bakterienkulturen mit einem sterilen Zahnstocher gepickt und in jeweils 3 ml LB-Medium mit entsprechender Antibiotika-Resistenz bei 37 °C für 16 h auf einem Schüttler kultiviert.

Für eine anschließende Midipräparation wurde die 3 ml Vorkultur in 100 ml LB-Medium mit entsprechender Antibiotika-Resistenz geimpft und erneut für ca. 16 h bei 37 °C auf dem Schüttler kultiviert.

3.5.2 Minipräparation des DNA-Plasmids

Für die DNA-Plasmid-Minipräparation wurde das Zyppy™ Plasmid-Miniprep Kit von Zymo Research nach Angaben des Herstellers verwendet. Dafür wurde die am Tag zuvor angesetzte Bakteriensuspension 30 sec zentrifugiert, das entstandene Pellet in 600 µl 1 x TE-Puffer resuspendiert und nach Kitanleitung weiter verarbeitet. Zur Bestimmung der Reinheit und der Konzentration der aufgereinigten Plasmid-DNA wurde photometrisch die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt.

3.5.3 Midipräparation des DNA-Plasmids

Die Midipräparation der Plasmid-DNA wurde mit dem Plasmid Midi Kit von Quiagen durchgeführt. Zunächst wurde die Über-Nacht-Bakterienkultur bei 4 °C und 4000 rpm für 20 min zentrifugiert und das Pellet wie in der Anleitung beschrieben weiterverarbeitet. Das aufgereinigte Plasmid-DNA-Pellet wurde abschließend in 200 µl 1 x TE-Puffer resuspendiert und die DNA-Reinheit sowie die –Konzentration photometrisch am Nano Drop bei OD₂₆₀ gegen Wasser bestimmt.

3.5.4 DNA-Gelelektrophorese

Um zu kontrollieren, ob die Plasmid-Transformation und Präparation in prokaryotischen Zellen und die anschließende Aufreinigung erfolgreich waren, wurde die Plasmid-DNA im elektrischen Feld aufgetrennt.

Für ein 1 %iges Agarose-Gel (50 ml) wurde 0,5 g Agarose in 50 ml 1 x TBE-Puffer aufgekocht, mit 8 µl 2000 x Gelstar versetzt und in eine Gelwanne mit Kamm gegossen. Nach vollständigem Erkalten der Agarose in einer Dunkelkammer wurde der Kamm entfernt und das Gel in eine mit TBE-Puffer gefüllten Elektrophorese-Wanne überführt. Die Proben und der Längenstandard wurden mit 6 x DNA-Load (Fermentas) gemischt und in die entsprechenden Geltaschen pipettiert. Durch Aufsetzen des Deckels wurde der Kontakt zur Spannungsquelle hergestellt. Die Auftrennung der DNA erfolgte bei 80 – 100 V. Die DNA bewegt sich aufgrund ihrer negativen Ladung, bedingt durch den Phosphatrest, zur Anode. Dabei wandern kleine Fragmente deutlich schneller als größere.

10 x TBE-Puffer: 89 mM Tris-Base
 89 mM Borsäure
 2 mM EDTA

3.5.5 Transfektion von Plasmid-DNA in eukaryotische Zellen

Für die Transfektion von Plasmid-DNA in eukaryotische Zellen wurde das Transfektionsreagenz TurboFect (Fermentas) eingesetzt, welches auf einem kationischen Polymer beruht, das kompakte, stabile und positiv geladene Komplexe mit der DNA bildet. Diese DNA-Komplexe sind vor dem Abbau geschützt und erleichtern die Gen-Aufnahme in eukaryotische Zellen.

Für die Transfektion wurden 2×10^5 Zellen pro well in einer 6-well-Kulturschale ausgesät und über Nacht im Brutschrank kultiviert. Für einen Transfektionsansatz wurden 4 µg Plasmid-DNA in 400 µl FCS-freiem DMEM und 6 µl TurboFect vermischt und für 25 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz gleichmäßig auf die Zellen gegeben und für 24 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert.

3.5.6 RNA-Isolation

Die RNA-Isolation wurde mit Hilfe des High Pure RNA Isolation Kits (Roche) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Zur Bestimmung der RNA-Konzentration und der –Reinheit wurde photometrisch die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 269 nm bestimmt. Um eine Verunreinigung der RNA mit Proteinen oder aromatischen Substanzen wie Phenolen auszuschließen, sollte der Quotient aus OD₂₆₀ und OD₂₈₀ $\geq 2,0$ sein.

3.5.7 cDNA-Synthese

Die cDNA-Synthese wurde mit Hilfe des Transcriptor First Strand cDNA-Synthesis Kit (Roche) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Um 20 µl cDNA zu erhalten, wurden 1,5 µl random Hexamere und Oligo-dT-Primer mit 1 µg totaler RNA für 10 min bei 65 °C im Thermocycler erhitzt. Durch Überführung des Reaktionsgefäßes auf Eis wurde die Denaturierungsreaktion gestoppt. Nach Zugabe von 7 µl Mastermix bestehend aus 4 µl 5 x Reaction Buffer, 0,5 µl Riboblock Inhibitor, 2 µl dNTPs und 0,5 µl RT-Transkriptase, wurde der Ansatz für 10 min bei 25 °C inkubiert. Die Primer binden an die RNA. Die Amplifikation erfolgte bei 50 °C für 60 min. Abschließend erfolgte die Denaturierung bei 70 °C.

3.5.8 Quantitative PCR

Die quantitative PCR wurde mit Hilfe des Quantitect SYBR-Green Kits (Qiagen) am Light Cycler von Roche durchgeführt. Der Fluoreszenzfarbstoff SYBR-Green lagert sich während des PCR-Laufs unspezifisch an die *minor groove* der dsDNA an. Die Fluoreszenz nimmt proportional mit der Menge der PCR-Produkte zu, was eine Quantifizierung ermöglicht. Die Messung der Emission erfolgt bei 522 nm. Für die Quantifizierung ist der *crossing point* (Ct-Wert) entscheidend. Dieser stellt den PCR-Zyklus dar, bei dem die Fluoreszenzintensität logarithmisch ansteigt.

Für einen Ansatz wurden 5 µl SYBR-Green-Mastermix (enthält SYBR-Green, Polymerase, dNTPs und MgCl₂) mit je 0,5 µl Primer (*forward* und *reverse*), 3,5 µl RNase-freies Wasser und 0,5 µl cDNA vermischt und in die Glaskapillare pipettiert. Die Analyse erfolgte anhand von Dreifachbestimmung. Die Auswertung erfolgte mit MS-Excel nach der Delta-Delta-Ct-Methode, bei der Target- und Referenzgen zueinander ins Verhältnis gesetzt werden. Hierbei spricht man von einer relativen Quantifizierung. Die PCR-Bedingungen wurden so gewählt, dass für alle untersuchten Gene eine ähnliche PCR-Effizienz erreicht werden konnte. Diese wurde mithilfe einer Verdünnungsreihe ermittelt. Daher konnten alle Werte anhand folgender Formel berechnet werden, wobei für E (Effizienz) ein Wert von 2 angenommen wurde:

$$r(\text{Ratio}) = \frac{E_{\text{target}}^{\Delta CT_{\text{target}}(\text{control-sample})}}{E_{\text{ref}}^{\Delta CT_{\text{ref}}(\text{control-sample})}}$$

Als Referenzgen wurde β-Aktin verwendet.

3.5.9 Genexpressions-Analyse

Mit dem *Whole Genome Microarray* von Agilent ist eine genomweite Analyse der Genexpression auf mRNA-Ebene möglich. Die Technik basiert auf der Hybridisierung der mRNA auf dem DNA-Chip. Die Intensität der Hybridisierung wird mittels Fluoreszenzfarbstoffen analysiert. Anhand der unterschiedlichen Genexpression von zwei verschiedenen Proben kann auf differentiell exprimierte Gene geschlossen werden. Mit dieser Technik ist es möglich die Expression mehrerer tausend Gene gleichzeitig zu betrachten.

Für die Genexpressions-Analyse wurde der 44 K Microarray von Agilent verwendet. Es wurden sowohl HaCaT-Keratinocyten als auch FaDu-HNC-Zellen untersucht. Die Zellen wurden zunächst mit einem S100A8-Plasmid transfiziert und geerntet. Als Kontrolle dienten gfp-transfizierte Zellen. Sofern nicht anders angegeben erfolgte die im Folgenden beschriebene Prozedur gemäß den Angaben des Herstellers. Mit Hilfe des High Pure RNA Isolation Kit von Roche wurde die RNA isoliert. Die Konzentration der RNA wurde im Photometer bestimmt und die Reinheit im Agilent Bioanalyser geprüft. Für die cDNA-Synthese wurden 200 ng RNA in 8,3 µl Nuklease-freiem H₂O gelöst und zusammen mit 1,2 µl T₇-Promotor-Primer für 10 Minuten bei 65 °C erhitzt. Anschließend wurden 2 µl Spike in Mix zugegeben. Nach Zugabe von 8,5 µl Master-Mix, bestehend aus 4 µl 5 x First Strand Buffer, 2 µl 0,1 M DTT, 1 µl 10 mM dNTP-Mix, 1 µl MMLV-RT und 0,5 µl RNase Inhibitor, wurde der Ansatz für 2 Stunden bei 40 °C inkubiert. Durch das folgende Erhitzen des Ansatzes auf 65 °C für 15 Minuten wurden die Enzyme M-MLV-RT (*Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase*) und RNase-Inhibitor deaktiviert.

Die anschließende Label-Reaktion erfolgte ebenso gemäß den Hersteller-Angaben. Dabei wurden Nukleotide, die mit dem Fluoreszenz-Farbstoff Cy3 gekoppelt waren in die cDNA eingebaut. Zu 20 µl cDNA wurde ein Master-Mix bestehend aus 15 µl Nuklease-freiem H₂O, 20 µl 4 x Transkriptionspuffer, 6 µl 0,1 M DTT, 8 µl NTP-Mix, 6,4 µl 50 % PEG (vorher bei 40 °C 1 Minute erhitzen), 0,5 µl RNase out, 0,6 µl Inorganic pyrophosphatase, 0,8 µl T₇ RNA-Polymerase und 2,4 µl Cyane-3 CTP gegeben. Die Label-Reaktion erfolgte bei 40 °C für 2 Stunden.

Um ungebundene Nukleotide, Salze und Proteine aus dem Ansatz zu entfernen, wurde dieser über spezielle Säulen (RNA Mini Kit von Qiagen) aufgereinigt. Hierzu wurden 20 µl H₂O, 350 µl RLT-Puffer und 250 µl 100 % Ethanol zugegeben und vorsichtig gemischt. 700 µl des Ansatzes wurden auf die Millipore Säulen aufgetragen und 30 Sekunden bei 4 °C und 13.000 g zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen. Auf die Säulen wurden 500 µl RPM-Puffer aufgetragen, für 30 Sekunden bei 4 °C und 13.000 g zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Es wurden nochmals 500 µl RPM-Puffer zugegeben und für 1 Minute zentrifugiert. Der Durchfluss wurde erneut verworfen. Anschließend wurde mit 30 µl RNase freiem H₂O eluiert. Hierfür wurde 30 Sekunden bei 4 °C und 13.000 g zentrifugiert. 2 µl des Eluats wurden entnommen, um die cDNA-Menge sowie die Einbaurate des Fluorochroms photometrisch zu bestimmen. Für eine erfolgreiche Hybridisierung sollten mindestens 1,65 µg cDNA und eine spezifische Aktivität von 6 pmol Cy3 pro µg cDNA vorliegen.

Für die Hybridisierung wurden zu den restlichen 28 µl Eluat 11 µl Blocking Agent, 14,8 µl H₂O und 2,2 µl Fragmentations-Puffer zugegeben. Der Ansatz wurde für 30 Minuten bei 60 °C erhitzt. Um die Fragmentationsreaktion zu stoppen, wurden 55 µl 2 x GE Hybridisation Buffer HI-RPM zugegeben. Der gesamte Reaktionsansatz wurde auf den in der Hybridisierungskammer liegenden glassket-slide pipettiert, der 44 K Microarray (Agilent) aufgelegt und die Kammer verschlossen. Die Hybridisierung erfolgte für 17 Stunden bei 65 °C und 10 g im Hybridisierungssofen von Agilent.

Nach der Hybridisierung wurde der Microarray in einem ersten und anschließend in einem zweiten (auf 37 °C vorgewärmt) Waschpuffer für jeweils 1 Minute gewaschen und im G2565CA Scanner von Agilent gescannt. Die Rohdaten wurden mit Feature Extraction vs. 10.5.1.1 (Agilent Technologies und Gene Spring GX v. 10.0.2 (Agilent Technologies) ausgewertet.

3.5.10 DNA-Microarray

Für die Expressionsanalyse Metastase-involvierter Gene wurde der Oligo GEMarray Human Metastasis Microarray (SA Bioscience) verwendet. Dieser DNA-Microarray enthält 128 Gene, die eine wesentliche Rolle bei der Tumor-Metastasierung spielen.

Für diese Analyse wurden HaCaT-Keratinocyten mit Annexin A5-spezifischer bzw. unspezifischer siRNA behandelt und entsprechend geerntet. Sofern nicht anders angegeben, wurden die im Folgenden beschriebenen Arbeitsschritte gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt. Mit Hilfe des High Pure RNA Isolation Kit (Roche) wurde die RNA isoliert, die Konzentration photometrisch bestimmt und die Reinheit im Agilent Bioanalyser vermessen. Unter Verwendung des TrueLabeling-AMP™ 2.0 Kits (Super Array) wurde die RNA mittels reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben, die wiederum durch *in vitro* Transkription zu Biotin-markierten cRNA-Sonden synthetisiert wurde. Die Aufreinigung erfolgte mit Hilfe des ArrayGrade™-cRNA cleanup Kits. Anschließend wurden 2 µg cRNA-Sonde mit den vorbehandelten Array-Membranen bei 60 °C über Nacht im Hybridisierungssofen inkubiert. Die Membranen wurden nach der Hybridisierung mehrfach gewaschen. Die Array-Spots, die ihre komplementäre cRNA gebunden hatten, wurden mittels Chemilumineszenz-Detektion

sichtbar gemacht. Dazu wurden die Membranen zur Reduzierung des Hintergrunds geblockt, mit AP-konjugierten Streptavidin inkubiert und mehrfach gewaschen. Abschließend wurde die Membran mit CDP-Star, was als Substrat der Chemilumineszenz dient, benetzt. Die Lumineszenzsignale wurden mittels Exposition eines Films (MioMax XAR Film, Kodak) detektiert. Die Auswertung der detektierten Signale erfolgte mit der LabImage-Software.

4 Ergebnisse

In der vorliegenden Promotion wurde die Methode der *Matrix assisted laser desorption/ionization* (MALDI) *imaging mass spectrometry* (IMS) an humanen Gewebeproben angewandt. Es wurden verschiedene Kopf-Hals-Tumor-Proben (*Head and neck cancer* - HNC) analysiert und ausgewertet. Schwerpunkt der Untersuchung stellte die Verteilung der S100-Proteine innerhalb der HNCs dar. S100A8, ein Mitglied der Ca^{2+} -bindenden S100-Proteinfamilie wurde funktionell charakterisiert und die Rolle während der Tumorphiliferation und Metastasierung näher untersucht. Annexin A5, ein weiteres Ca^{2+} -bindendes Protein, wurde hinsichtlich seines Migrations- und Invasionspotentials charakterisiert, da auch dieses Protein in vorangegangenen Arbeiten unserer Arbeitsgruppe an der invasiven Front von Kopf-Hals-Tumoren detektiert werden konnte.

4.1 MALDI-IMS-Analyse von Kopf-Hals-Tumoren

4.1.1 Etablierung der MALDI-IMS-Technik

In dieser Arbeit konnte die Technik des MALDI-IMS von humanem Gewebe etabliert und angewandt werden. Mit dieser Methode ist es möglich massenspektrometrische Untersuchungen direkt am Gewebe vorzunehmen und molekulare Proteinprofile an dünnen Gewebeschnitten zu erstellen. Die Untersuchungen wurden am Institut für Organische und Makromolekulare Chemie an der Friedrich-Schiller-Universität Jena an einem Ultraflex III MALDI-TOF/TOF durchgeführt.

Es musste zunächst ausgetestet werden, wie das Gewebe am schonendsten behandelt wird und welche Matrixapplikation die besten Spektren erzeugt. In Vorarbeiten wurden unterschiedliche Matrices in verschiedenen Konzentrationen getestet und die beste Matrixapplikation ermittelt. Dafür wurde zunächst Leber- und Nierengewebe von Ratten verwendet.

Anfangs wurde die Matrix über manuelles Pipettieren auf den Schnitt aufgetragen. Dafür wurden verschiedene Tropfenmengen Matrix auf dem Gewebe verteilt. Es stellte sich schnell heraus, dass einzelne Tropfen kein ausreichend aussagekräftiges Spektrum liefern. Deshalb wurde die Tropfenmenge erhöht. 10 Tropfen 20 mg/ml Sinapinsäure (SPA) in 50 % ACN und 50 % 0,1 % TFA wurden aufgetragen, luftgetrocknet und erneut 10 Tropfen aufgetragen. 40 bis 50 Tropfen Sinapinsäure pro Spot reichen aus, um ein annähernd aussagekräftiges Spektrum zu erhalten (Abb.6).

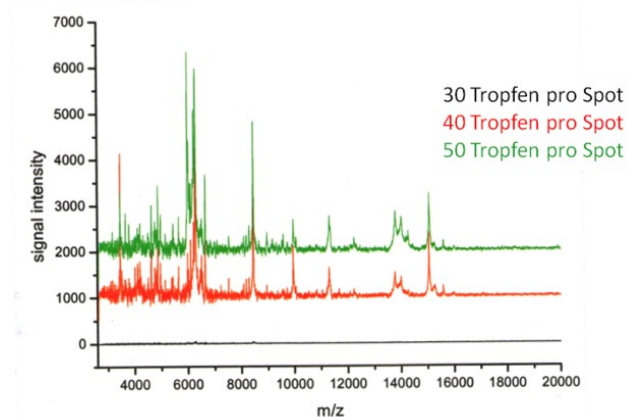


Abbildung 6: Manuelles Pipettieren der Matrix auf Gewebeschnitte

Grafische Darstellung der mittels MALDI-Messung erzielten Spektren. Pro Spot wurden manuell 30 (schwarzes Spektrum), 40 (rotes Spektrum) bzw. 50 (grünes Spektrum) Tropfen 20 mg/ml Sinapinsäure als Matrix aufgetragen.

Das manuelle Pipettieren der Matrix ist sehr mühsam und die räumliche Auflösung innerhalb des Gewebes geht mit dieser Art der Matrixapplikation verloren, da der Durchmesser der Matrixspots zu groß (1500 μm bis 2000 μm) ist. Aus diesem Grund wurde das *InkJet printing* genutzt, um die Matrix mit einer Art Drucker auf das Gewebe aufzutragen. So können Pikoliter Matrix pro Spot gedruckt werden. Der Durchmesser der einzelnen Spots beträgt im Durchschnitt 200 μm . Das *InkJet printing* wurde am Institut für Organische und Makromolekulare Chemie an der Friedrich-Schiller-Universität Jena in der Arbeitsgruppe von Prof. Schubert von Dr. Joseph T. Delaney durchgeführt. Dabei wurden verschiedene Matrices ausgetestet. 2,5-dihydroxybenzoic acid (DHB) und α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid (HCCA) sind gebräuchliche Matrices, um Protein-Verdaue, Oligosaccharide, Glykopeptide und Proteine, die kleiner als 10 kDa sind zu detektieren. Ferulsäure (FA) wird genutzt, um Proteine zu detektieren. Sinapinsäure, mit der man ebenfalls Proteine detektiert, konnte nicht mittels *InkJet printing* appliziert werden, da die Matrix zu schnell auskristallisiert ist und die Nadel des Druckers verstopft hat. 30 mg/ml DHB in 50 % ACN und 50 % 0,4 % TFA und 20 mg/ml FA in 50 % ACN und 50 % 0,1 % TFA erzeugten auf Nieren-Gewebe ausreichend gute Spektren. Mit HCCA konnten keine aussagekräftigen Spektren detektiert werden (Abb. 7).

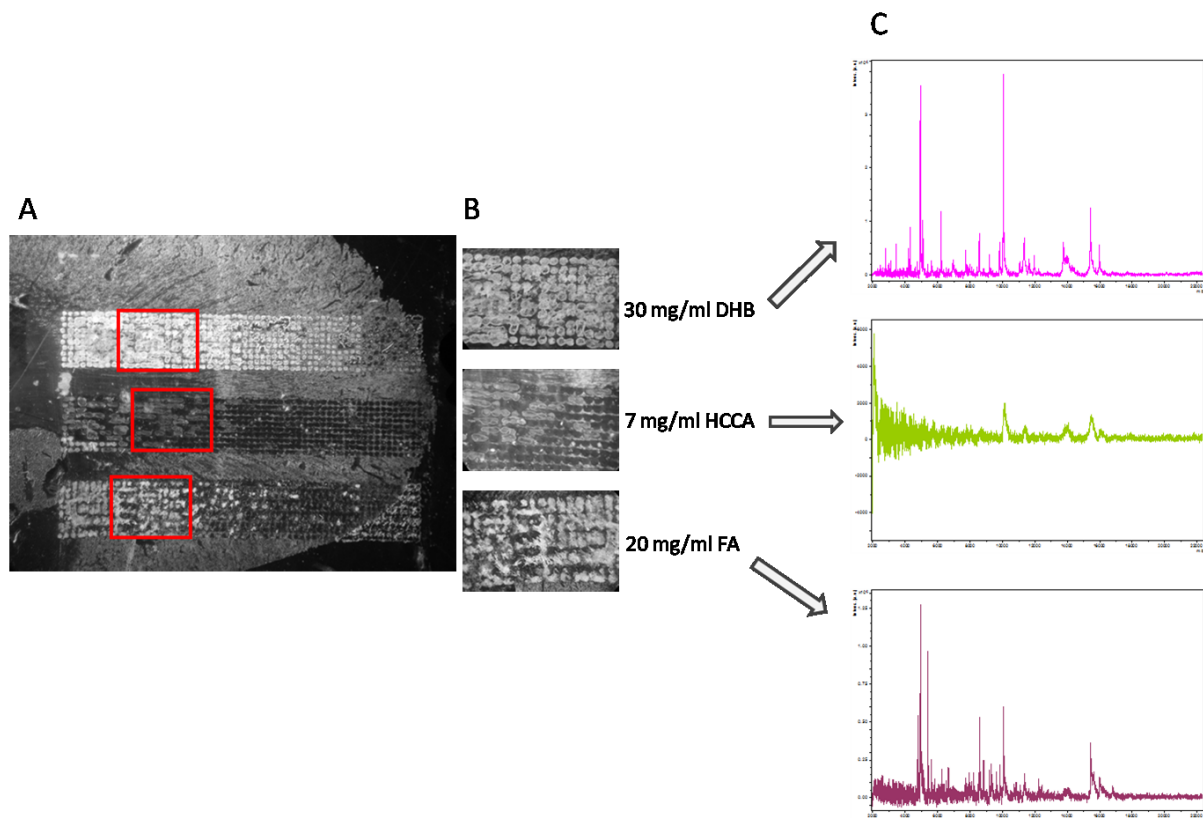


Abbildung 7: *InkJet printing* von DHB, HCCA und FA auf Nierengewebe

Mittels *InkJet printing* aufgetragen wurden 30 mg/ml DHB, 7 mg/ml HCCA und 20 mg/ml FA. (A) Photographische Darstellung der geprinteten Matrix auf Ratten-Nieren-Gewebe. (B) Vergrößerung der Matrixspots. (C) Mit MALDI-MS detektierte Spektren. DHB und FA liefern ausreichend gute Spektren. Mit HCCA konnten keine aussagekräftigen Spektren nach einer MALDI-Messung detektiert werden.

Mit *InkJet printing* war es möglich, Spektren mit einer zufriedenstellenden Intensität zu erzielen. Dieses Verfahren ist jedoch sehr zeitintensiv und das Gewebe wird stark beansprucht. Oft entstehen bei der Matrixapplikation Löcher im Gewebe. Desweiteren ist die räumliche Auflösung innerhalb des Gewebes immer noch sehr gering und die Abstände der einzelnen Spots zu groß.

Um die Auflösung zu verbessern und die Matrixapplikation gewebeschonender durchzuführen, wurde der ImagePrep (Bruker Daltonik) getestet. Damit ist es möglich, die zelluläre und molekulare Morphologie innerhalb des Gewebes aufrechtzuerhalten. Hierbei wird die Matrix in einer mit Stickstoff gefüllten Kammer vernebelt. So entsteht eine gleichmäßige Matrixschicht über den gesamten Schnitt verteilt.

Die Matrixapplikation wurde zunächst wieder an Nieren-Gewebe von Ratten etabliert. Es wurden 10 mg/ml Sinapinsäure in 60 % ACN und 40 % 0,3 % TFA als Matrix eingesetzt. Das Auftragen der Matrix erfolgte mit Hilfe des ImagePrep (Bruker Daltonik) nach Angaben des Herstellers. Es konnten sehr gute Spektren mit einer hohen Intensität detektiert werden (Abb. 8). Mittels MALDI-IMS konnte das Proteinprofil der 3 funktionellen Bereiche der Niere Cortex, Medulla und Pelvis massenspektrometrisch dargestellt werden (Abb. 9).

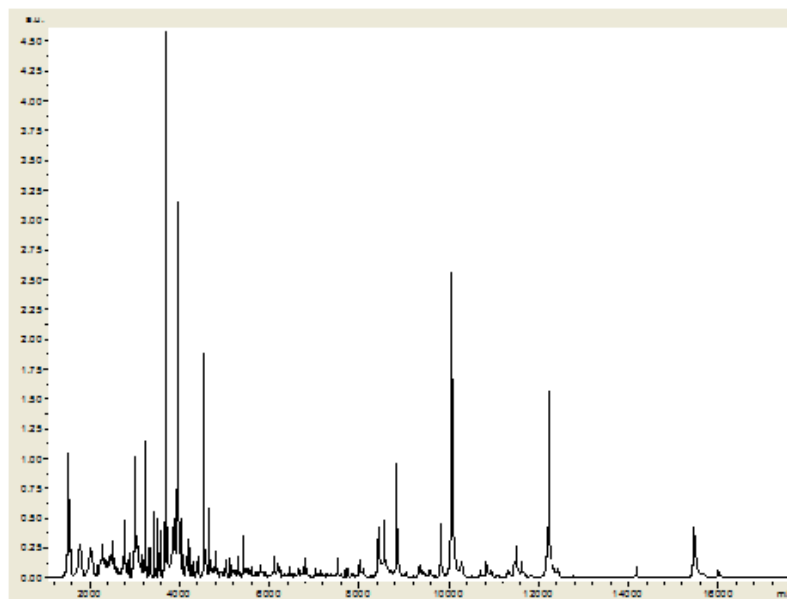


Abbildung 8: Gesamt-Protein-Spektrum einer Ratten-Niere

Dargestellt ist das Massenspektrum einer Ratten-Niere im Bereich von 1000 Da bis 18.000 Da. Die Matrix wurde mit Hilfe des ImagePrep nach Angaben des Herstellers aufgetragen.

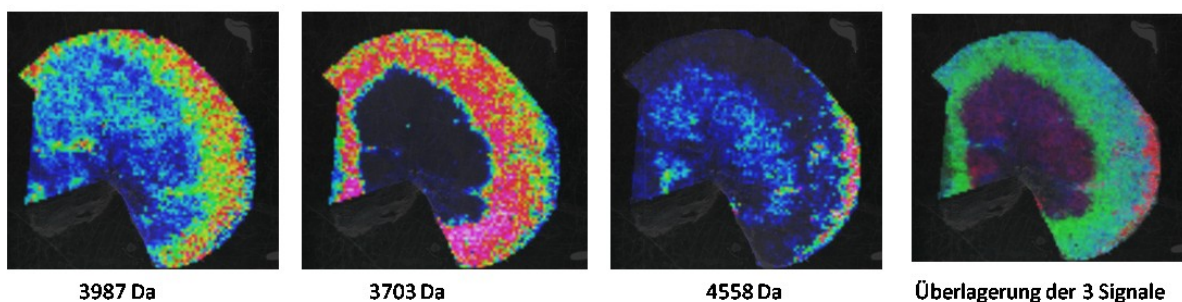


Abbildung 9: MALDI-IMS Signale einer Ratten-Niere

Dargestellt sind ausgewählte detektierte Signale von einer Ratten-Niere. Das Signal von 3987 Da ist fast ausschließlich im Cortex exprimiert. Das Signal von 3703 Da konnte ausschließlich in der Medulla und das Signal von 4558 Da im Pelvis detektiert werden.

4.1.2 Messung verschiedener Kopf-Hals-Tumor-Proben

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden 20 Kopf-Hals-Tumor-Proben mittels MALDI-IMS gemessen und ausgewertet. Die Gewebeprobe wurde von Oberarzt Dr. Wittekind der Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde des Universitätsklinikums Jena zur Verfügung gestellt.

Mit der Technik des MALDI-IMS wird jeweils ein gesamter Gewebeschnitt einer Tumorprobe gemessen. Mit Hilfe eines speziellen Lasers (smartbeam) wird die Gewebeprobe mit einer Auflösung von 50 µm gescannt und Massenspektren für jeden Messpunkt erzeugt. Eine Analysesoftware setzt die erzeugten Spektren in Farbcodes um und erstellt ein Massenbild des Gewebes. Dabei kann die Verteilung der einzelnen Signale des Spektrums innerhalb des Gewebes dargestellt werden. Jedes Signal kann in Falschfarben, die die Konzentration des Signals widerspiegeln, auf dem Gewebeschnitt detektiert werden. Kombinierte Signale können verschiedene funktionelle Regionen innerhalb einer Gewebeprobe charakterisieren. Somit ist es möglich die Verteilung von hunderten unbekannten Signalen mit einer einzigen Messung aufzuzeigen.

Vorbereitend für die MALDI-IMS-Analyse wurden 10 µm dicke Kryostatschnitte von Gewebeprobe aus Kopf-Hals-Tumoren auf einen spezifischen MALDI-Imaging-Objektträger (ITO-slide) übertragen und mit Alkohol fixiert. Mit dem ImagePrep wurden 10 mg/ml Sinapinsäure als Matrix auf das Gewebe aufgetragen und anschließend im Massenspektrometer analysiert.

Abbildung 10 zeigt ein Gesamtspektrum einer repräsentativen MALDI-IMS-Messung eines Tonsillenkarzinom-Gewebeschnittes. Abbildung 11 zeigt die dazugehörigen Signale in einem Gewebeausschnitt. Dabei konnten Signale detektiert werden, die sowohl im Bindegewebe und im Tumorstroma als auch im nekrotischen Gewebe exprimiert werden (3444 Da, 3429 Da) und Signale, die eine Expression fast ausschließlich im Tumorgewebe (10827 Da, 11642 Da) zeigen. Die Expression anderer Signale (5044 Da, 7565 Da) ist ubiquitär im Gewebe verteilt (Abb. 7).

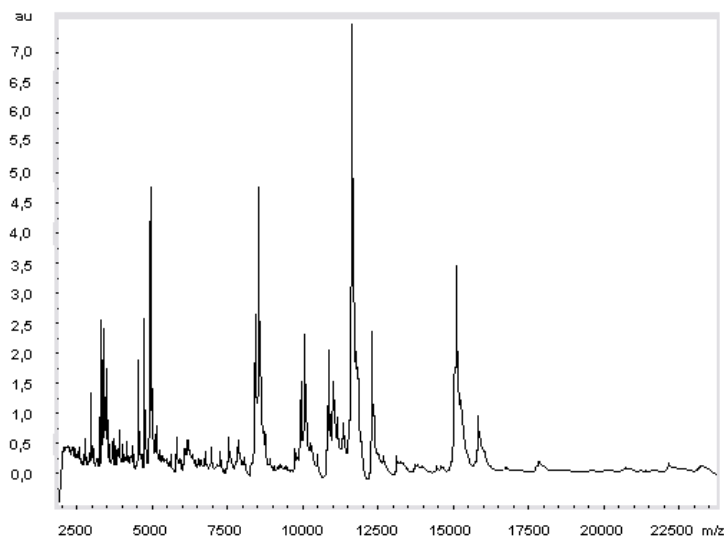
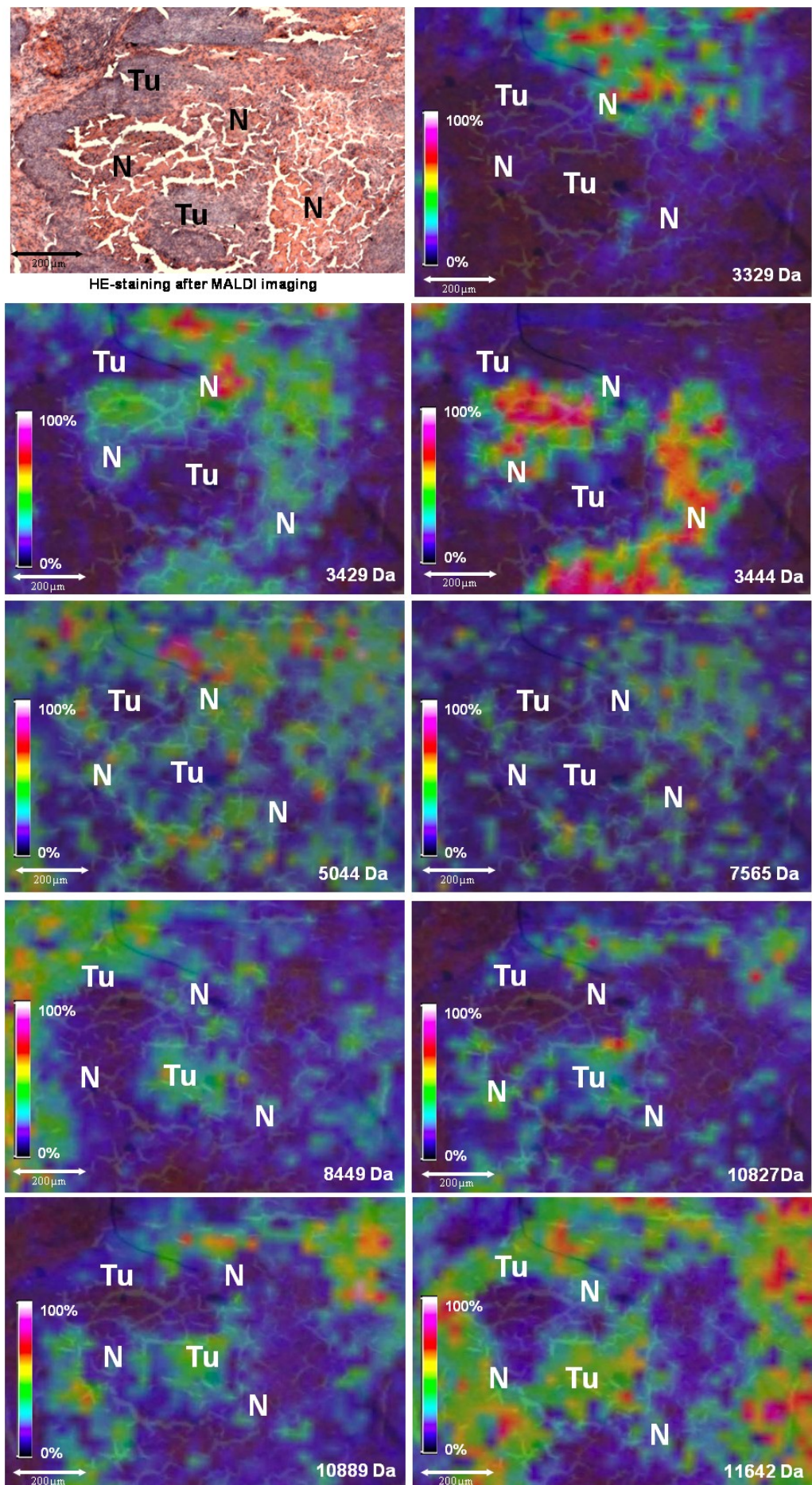


Abbildung 10: Gesamtspektrum eines Kopf-Hals-Tumors nach MALDI-IMS-Messung

Dargestellt ist ein Spektrum einer Tonsillenkarzinom-Gewebeprobe im Bereich von 2500 Da bis 22500 Da.



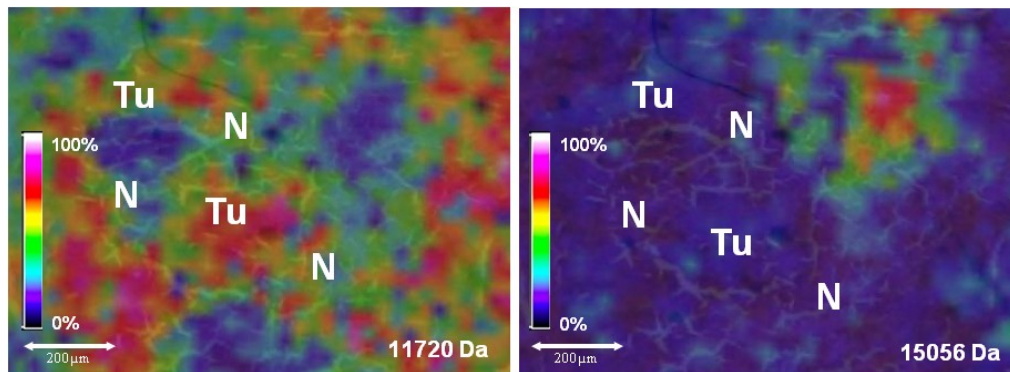


Abbildung 11: MALDI-IMS-Messung eines Tonsillenkarzinoms

MALDI-IMS-Signale und deren Verteilung in einem Ausschnitt eines Kopf-Hals-Tumors. Oben links zeigt den HE-Schnitt nach der MALDI-Messung. Die Falschfarben-Skala von 0 % bis 100 % repräsentiert die semiquantitative Abschätzung des Proteinexpressionslevels. N zeigt nekrotisches Tumorgewebe, Tu zeigt das epitheliale Tumorgewebe.

Auffallend bei allen MALDI-IMS-Messungen der HNCs ist, dass ein gleiches Muster im Gesamtspektrum zu erkennen ist. Dabei ist immer ein 3er Peak um 3400 Da, ein 3er Peak um 5000 Da, einer um 8600 Da und ein 3er Peak um 10800 Da zu erkennen (Abb. 12).

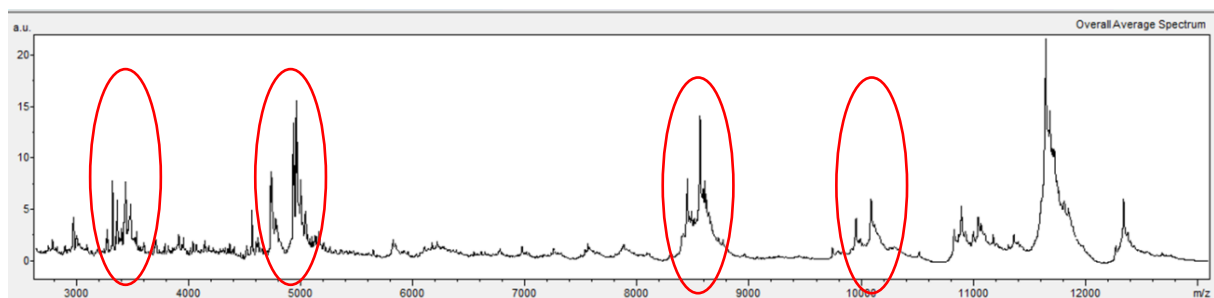


Abbildung 12: Ausschnitt eines MALDI-IMS-Spektrums

Dargestellt ist der Ausschnitt eines repräsentativen MALDI-IMS-Spektrums einer HNC-Gewebeprobe im Bereich von 2500 Da bis 13000 Da. Die rote Markierung zeigt die detektierten 3er Peaks.

Die Lokalisation dieser Signale wurde in den einzelnen Kopf-Hals-Tumoren mittels MALDI-IMS bestimmt. Die Signale um 3400 Da und 10800 Da konnten in dieser Arbeit mit einer Kombination aus MALDI-IMS, SELDI-MS und Immunhistochemie als humane Defensine bzw. als S100A8 identifiziert werden (siehe Teil 4.1.3). Bei den Signalen um 8600 Da wurde auf Grund der Proteingröße vermutet, dass es sich um Ubiquitin handelt. Diese Vermutungen wurden in einem Vergleich der MALDI-IMS-Ergebnisse und Immunhistochemie (IHC) überprüft. Dafür wurde nach der MALDI-IMS-Analyse die Expression der Proteine mittels (IHC) an einem seriellen Schnitt untersucht. Die Auswertung der IHC erfolgte zusammen mit dem Pathologen Dr. Günther Ernst (CUCA).

Das Signal von 3444 Da konnte mittels MALDI-IMS vorwiegend im Bindegewebe und im Tumorstroma als auch im nekrotischen Gewebe detektiert werden. Auch die Immunhistochemie von dem Protein humanes Defensin zeigt eine Expression im Bindegewebe und im nekrotischen Teil des Gewebes, jedoch keine Expression im epithelialen Tumor (Abb. 13 A). Das Signal bei 8449 Da konnte mit der MALDI-IMS-Messung fast ausschließlich im Tumorbereich detektiert werden. Die immunhistochemische Färbung von Ubiquitin zeigt eine positive Reaktion vor allem im Tumorbereich an (Abb. 13 B). S100A8 (10827 Da) konnte sowohl bei der MALDI-IMS-Messung als auch in der immunhistochemischen Färbung stärker im epithelialen Tumorbereich als im nekrotischen Gewebe detektiert werden (Abb. 13 C).

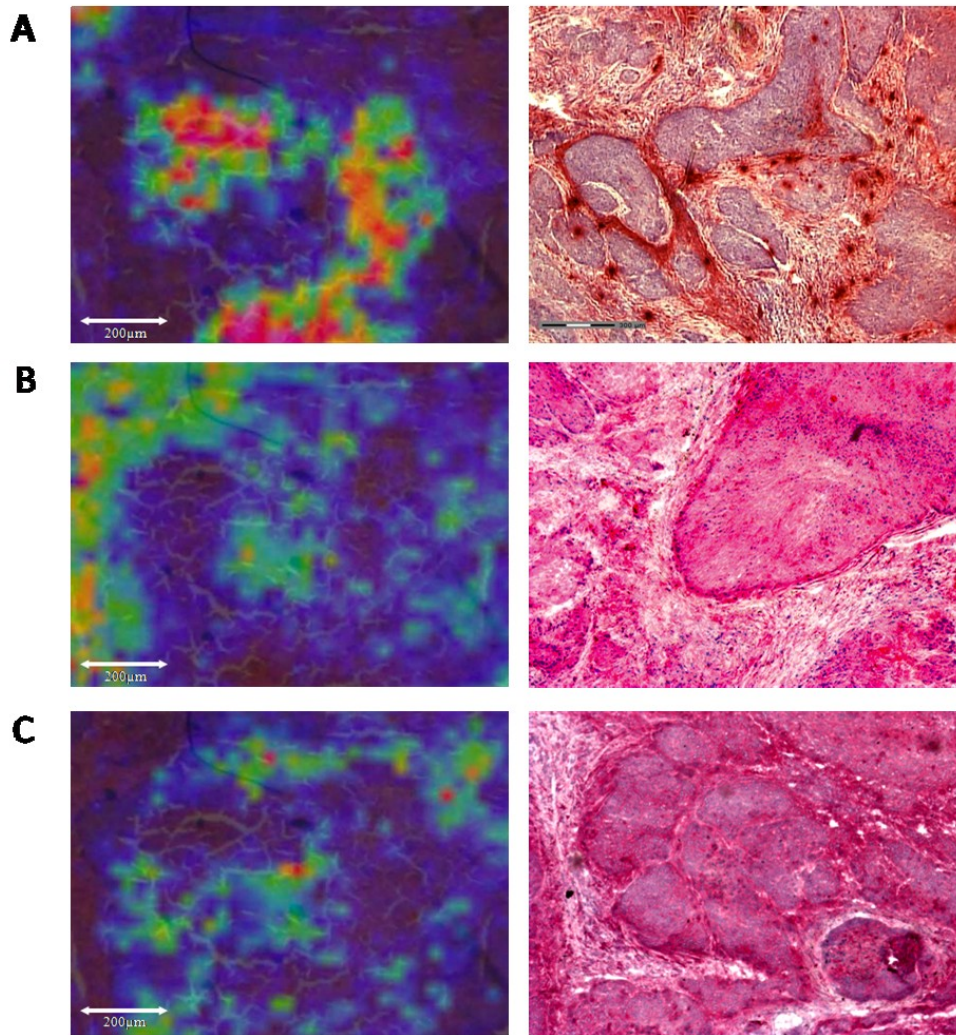


Abbildung 13: Vergleich MALDI-IMS-Analyse und IHC

Die mit MALDI-IMS detektierten Signale von 3444 Da, 8449 Da und 10827 Da konnten mittels IHC als humanes Defensin (A), Ubiquitin (B) bzw. S100A8 (C) identifiziert werden. Die IHC (5 x Vergrößerung) zeigt nicht den identischen, aber einen seriellen Schnitt der Gewebeprobe.

4.1.3 Etablierung einer Kombination aus MALDI-IMS, SELDI-MS und Immunhistochemie für die Darstellung der räumlichen Verteilung von Proteinen innerhalb von Geweben

4.1.3.1 MALDI-IMS Analyse der Kopf-Hals-Tumore

Mit der MALDI-IMS-Analyse konnten unter anderem charakteristische Proteinpeaks von 3372 Da, 3444 Da und 3488 Da detektiert werden, die eine sehr hohe Intensität sowohl im Tumorstroma als auch im Bindegewebe und im nekrotischen Gewebe aufweisen (Abb.14 A, B, C, D). Desweiteren konnte ein Proteinpeak von 10827 Da detektiert werden, der nur im Tumorgewebe, vor allem an der Peripherie des epithelialen Tumors, sowie an der Grenze zum Stroma exprimiert wird (Abb. 14 E, F).

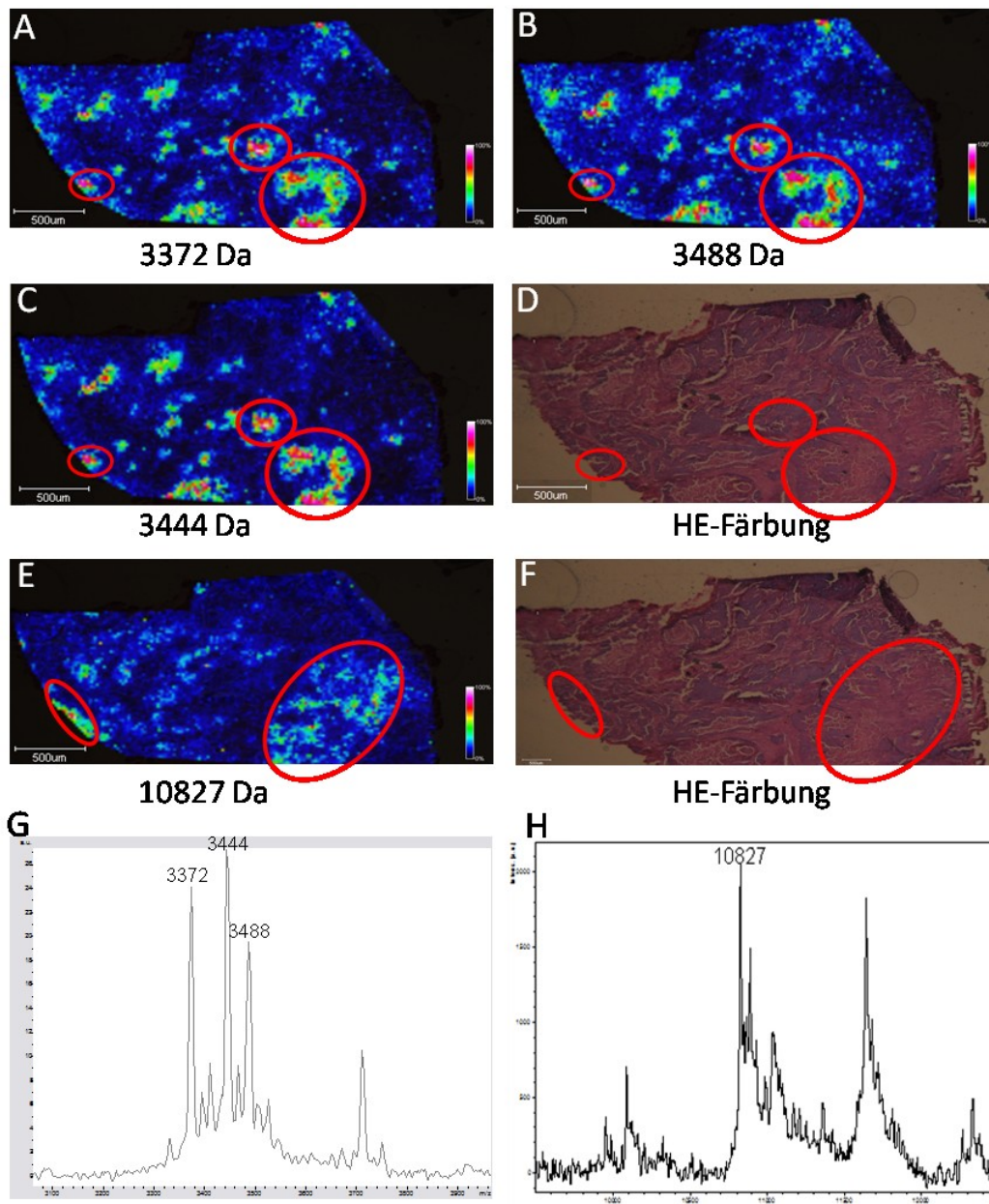


Abbildung 14: MALDI-IMS-Analyse von Kopf-Hals-Tumoren:

Die MALDI-IMS Analyse einer Gewebeprobe eines Kopf-Hals-Tumors zeigt charakteristische Signale bei 3372 Da, 3444 Da und 3488 Da, die im Bindegewebe und im nekrotischen Bereich lokalisiert sind (A, B und C). Außerdem wurde ein Signal von 10827 Da detektiert, was fast ausschließlich im Tumorstroma lokalisiert ist (E). Die Abbildungen (D) und (F) zeigen das korrespondierende HE-Bild mit den entsprechend eingezeichneten Regionen, in denen die Signale detektiert wurden. (G) Massenspektrum im Bereich von 3000 Da bis 4000 Da. (H) Massenspektrum im Bereich von 10400 Da bis 11400 Da.

4.1.3.2 Die SELDI-MS-Analyse zeigt die gleiche Proteinverteilung

Mit einer in unserer Arbeitsgruppe entwickelten Kombination aus Mikrodissektion und toc-MS (tissue on chip-Massenspektrometrie) [Escher et al. 2010] ist es möglich spezifische Bereiche aus Gewebeproben auszuschneiden, diese direkt auf die Oberfläche von ProteinChips zu transferieren und anschließend im SELDI-Massenspektrometer zu analysieren.

In der vorliegenden Arbeit wurden Bereiche, in denen die oben genannten charakteristischen Peaks mittels MALDI-IMS detektiert wurden, in einem seriellen nativen Gewebeschnitt mittels eines

P.A.L.M.-Laser-capture-Mikroskops ausgeschnitten (Abb. 15) und auf einen vorher aktivierten CM10-ProteinChip übertragen. Die Gewebestückchen wurden direkt auf dem Kationenaustauscher lysiert und im SELDI-MS analysiert. Dabei konnten im Bindegewebe und im nekrotischen Gewebeabschnitt erneut die charakteristischen Proteinpeaks bei 3368 Da, 3440 Da und 3485 Da detektiert werden, die im Tumorgewebe nicht exprimiert werden. Im Vergleich dazu konnte in der epithelialen Tumorregion des Gewebes ein Signal von 10860 Da detektiert werden, welches in der Nekrose nur eine sehr geringe Intensität aufweist (Abb. 16).



Abbildung 15: Ungefärbter Gewebeschnitt für die Mikrodissektion

Mittels eines Laser-capture Mikroskops wurden sowohl Tumor als auch Nekrose aus einem ungefärbten Gewebeschnitt ausgeschnitten. Die roten Linien zeigen den Verlauf des Lasers während der Mikrodissektion.

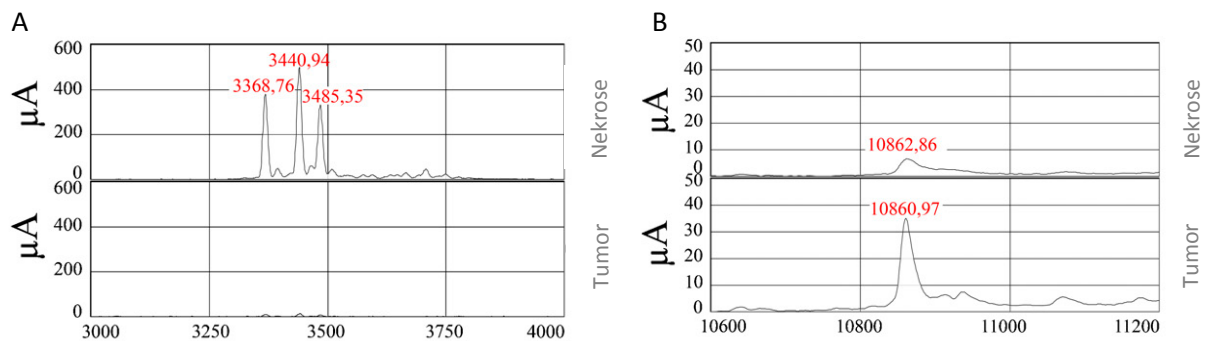


Abbildung 16: SELDI-MS-Spektren des nekrotischen sowie des Tumorgewebes

Die mikrodissoziierten Bereiche wurden direkt auf dem Proteinchip lysiert und im SELDI-MS vermessen. Auch hier konnte gezeigt werden, dass 3 charakteristische Peaks (3368 Da, 3440 Da und 3485 Da) mit einer hohen Intensität im nekrotischen Gewebe vorkommen und im Vergleich dazu nahezu kein Signal im Tumorgewebe desselben Gewebes detektiert wurde (A). Hingegen konnte im Tumorgewebe ein Signal von 10860 Da nachgewiesen werden, welches in der Nekrose signifikant reduziert vorliegt (B).

4.1.3.3 Genaue Lokalisation der detektierten Proteine innerhalb des Gewebes mittels Immunhistochemie

In früheren SELDI-MS-Studien unserer Arbeitsgruppe konnten die Signale von 3371 Da, 3442 Da und 3486 Da als humane α -Defensine (HNP1-3) identifiziert werden [Melle et al.]. Ebenso wurde der Peak bei 10,8 kDa mittels SELDI-MS detektiert und als S100A8 identifiziert [Melle et al. 2005]. Diese Vorarbeiten wurden für die vorliegende Arbeit genutzt und es sollte die exakte Lokalisation der genannten Proteine innerhalb des Gewebes mittels Immunhistochemie bestimmt und mit den aus MALDI-IMS und SELDI-MS erhaltenen Daten verglichen werden.

Dafür wurden serielle Schnitte des Tumorgewebes mit spezifischen anti-Defensin 1-3 (HNP1-3) beziehungsweise anti-S100A8 immunhistochemisch gefärbt und zusammen mit einem erfahrenen Pathologen (Dr. Günther Ernst (CUCA)) mikroskopisch ausgewertet.

In dem mit HNP1-3 gefärbten Gewebeschnitt ist eine stark positive Reaktion sowohl im Tumorstroma und im Bindegewebe als auch in nekrotischen Arealen erkennbar. Das Tumorgewebe selbst zeigt hingegen keine positive Reaktion (Abb. 17 A). Die immunhistochemische Färbung mit einem spezifischen S100A8 Antikörper zeigt eine stark positive Reaktion im Tumorgewebe, besonders in der Peripherie des epithelialen Tumors, die an das Tumorstroma angrenzt (Abb. 17 B und 17 C).

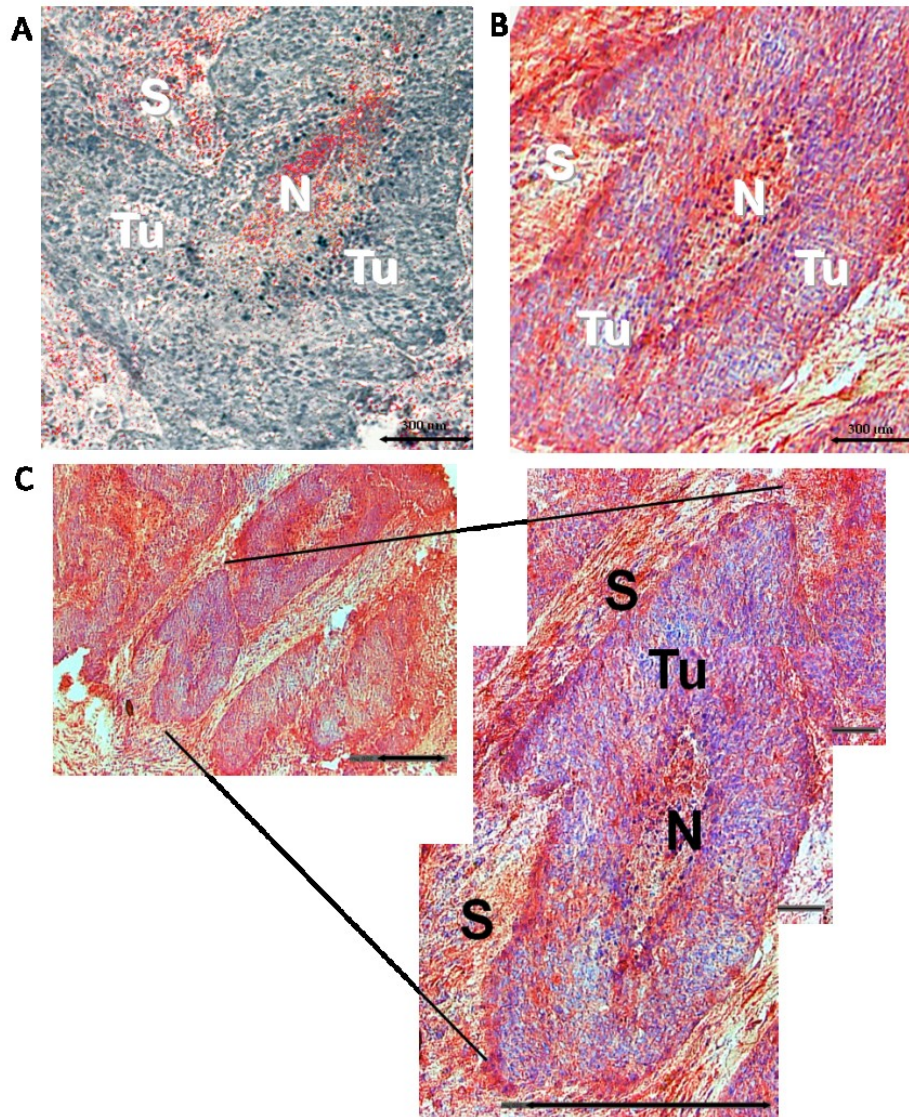


Abbildung 17: Immunhistochemische Färbungen von HNP1-3 und S100A8

Serielle Tumorschnitte wurden mit einem spezifischen Antikörper gegen humane Defensine (HNP1-3) beziehungsweise gegen S100A8 immunhistologisch gefärbt. Dabei zeigen die humanen Defensine (HNP1-3) eine stark positive Reaktion des Tumorstromas, des Bindegewebes und der Nekrose (A). S100A8 hingegen zeigt eine positive Reaktion im Tumorgewebe (B), vor allem an Grenzen zum Tumorstroma (C).

4.1.4 Identifizierung von S100A8 mittels Immundepletion und Immuncapturing

Bei einer Immundepletion bzw. einem Immuncapturing ist es möglich mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers ein Protein aus einem Zelllysats zu depletieren bzw. zu isolieren.

In der vorliegenden Arbeit sollte S100A8 aus einem seriellen Kryoschnitt der Tumorprobe, in der S100A8 detektiert wurde, depletiert bzw. präzipitiert werden. Dafür wurde mittels Mikrodissektion der spezifische Tumorbereich ausgeschnitten und lysiert. Ein spezifischer S100A8-Antikörper wurde an Protein-A-Agarose Beads gekoppelt. Nach der Inkubation des Lysats mit den Antikörper-gekoppelten Beads wurde für die Immundepletion der Überstand, für das Immuncapturing das Eluat mittels SELDI-MS untersucht. Als Kontrolle diente ein unspezifischer IgG-Antikörper, der anstelle des spezifischen S100A8-Antikörpers an die Protein-A-Agarose-Beads gekoppelt wurde.

Nach der Immundepletion konnte der Peak um 10,8 kDa in der spezifischen S100A8-Probe im Vergleich zur unspezifischen Kontrolle deutlich reduziert werden. Die IgG-Kontrolle weist den gleichen Peak mit einer 2-fach höheren Intensität auf (Abb. 18).

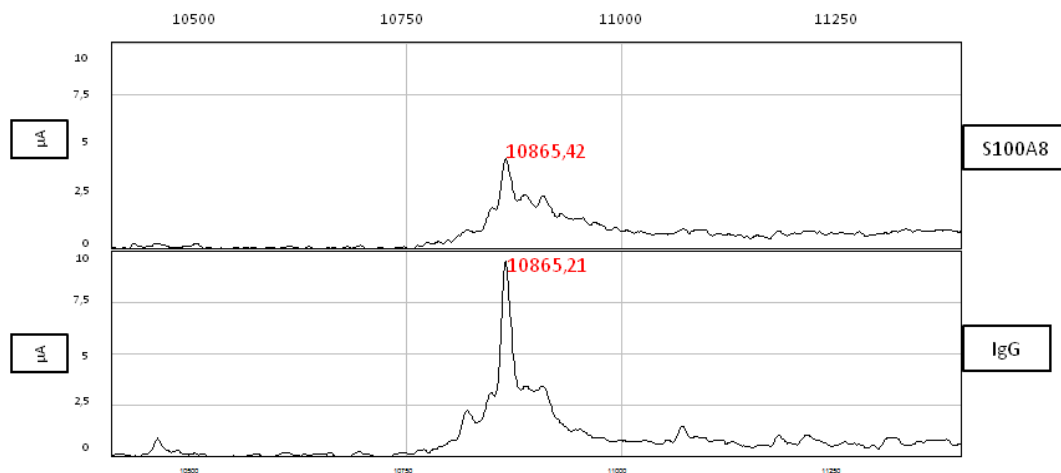


Abbildung 18: Immundepletion von S100A8

Mittels Mikrodissektion wurde der Tumorbereich der Kopf-Hals-Tumor-Probe ausgeschnitten und lysiert. Ein spezifischer S100A8-Antikörper wurde an Protein-A-Agarose-Beads gekoppelt und mit dem Lysat inkubiert. Der Überstand wurde im SELDI-MS analysiert. Dabei konnte der Peak bei 10,8 kDa im Vergleich zur unspezifischen Negativkontrolle reduziert werden.

Beim Immuncapturing konnte mit einem spezifischen S100A8-Antikörper ein Peak von 10,8 kDa präzipitiert werden, der im Vergleich zur unspezifischen Kontrolle eine 3-fach höhere Intensität aufweist (Abb. 19).

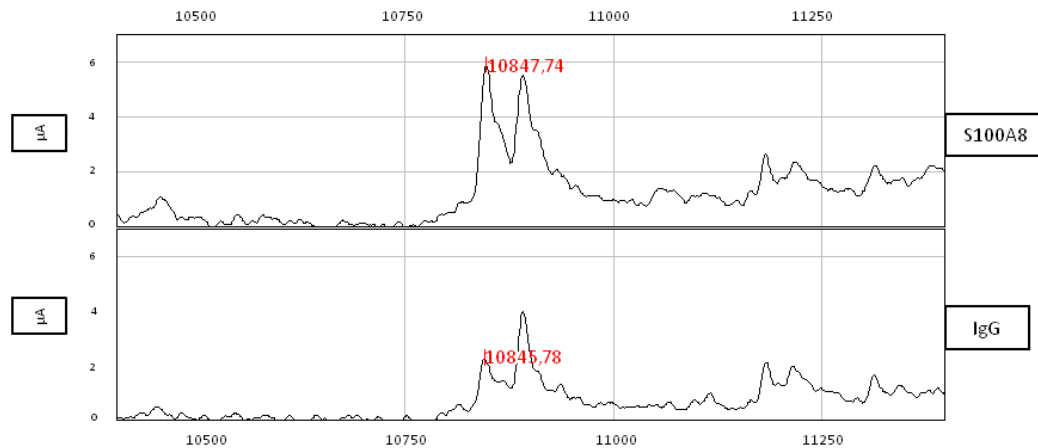


Abbildung 19: Immuncapturing von S100A8

Das Lysat des mikrodissoziierten Tumorbereichs wurde an Protein-A-Agarose-Beads, die mit einem spezifischen S100A8-Antikörper gekoppelt waren, gebunden. Nach der Inkubation wurde der Überstand verworfen und das präzipitierte Protein eluiert und im SELDI vermessen. Mit Hilfe des spezifischen S100A8-Antikörpers konnte der Peak von 10,8 kDa präzipitiert werden. Das Signal weist im Vergleich zur unspezifischen Negativkontrolle eine 3-fach höhere Intensität auf.

4.1.5 Verteilung verschiedener S100-Proteine innerhalb der Kopf-Hals-Tumore

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Verteilung von S100A8 und dessen Protein-Familienmitgliedern innerhalb der Kopf-Hals-Tumore mit Hilfe der MALDI-IMS-Analyse untersucht. Beispielhaft werden hier ein Zungenrandkarzinom (Abb. 20), ein Tonsillenkarcinom (Abb. 21) und ein Vallecula-Karzinom (Abb. 22) gezeigt. Auffallend dabei ist, dass die detektierten S100-Signale eine annähernd identische Lokalisation innerhalb des Gewebes aufweisen.

Beim Zungenrandkarzinom (HNC 270) konnten S100A8 (10834 Da), S100A10 (11188 Da), S100A7 (11432 Da) und S100A11 (11732 Da) detektiert werden. S100A8, S100A10 und S100A7 zeigen vorwiegend eine Lokalisation im Tumorbereich des Gewebes auf. S100A11 ist überwiegend im Tumorbereich lokalisiert, konnte aber auch in Teilen des Normalgewebes detektiert werden (Abb. 20).

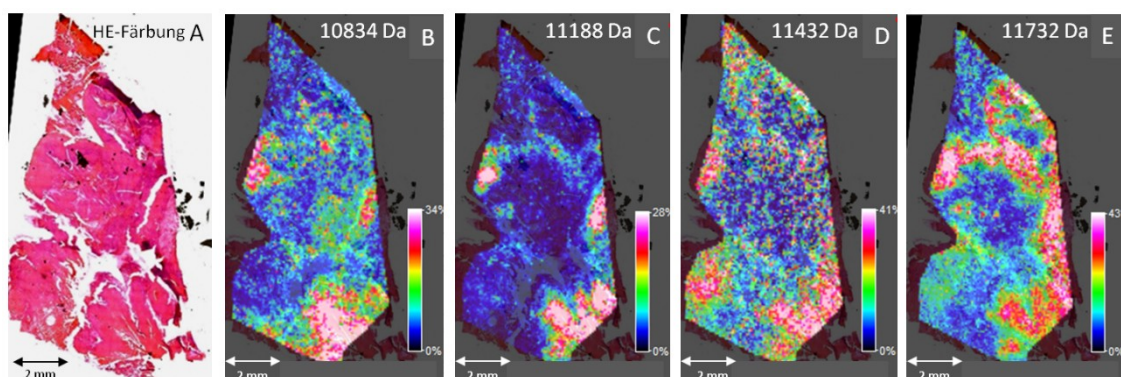


Abbildung 20: Verteilung der S100-Signale innerhalb eines Zungenrandkarzinoms

Mittels MALDI-IMS konnte die Verteilung von 4 S100-Proteinen (S100A8, S100A10, S100A7 und S100A11) innerhalb einer Gewebeprobe aufgezeigt werden. Alle dargestellten S100-Proteine weisen eine annähernd identische Lokalisation vorwiegend im Tumorbereich auf. (A) zeigt den HE-gefärbten Schnitt nach der MALDI-Messung, (B) – (E) Verteilung der detektierten Signale innerhalb des Gewebes.

Beim Tonsillenkarcinom (HNC 245) konnten S100A8 (10830 Da), S100A9 (13126 Da), S100A10 (11208 Da), S100A2 (11021 Da) und S100A11 (11720 Da) detektiert werden. Dabei zeigen S100A8, S100A9, S100A10 und S100A2 eine vorwiegende Lokalisation innerhalb des Tumorgewebes. S100A11 zeigt eine ubiquitäre Verbreitung im gesamten Gewebe (Abb. 21).

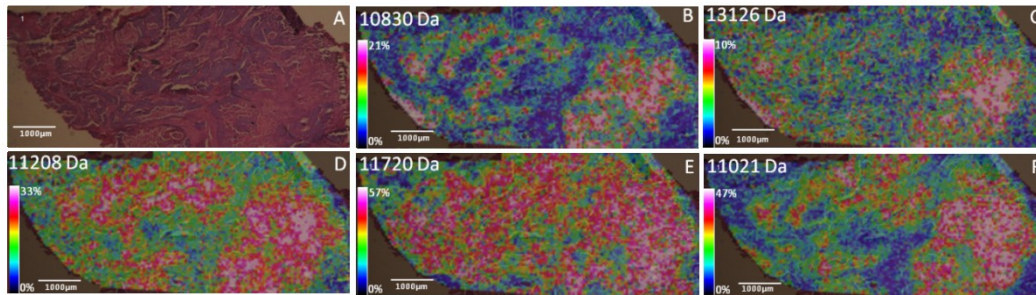


Abbildung 21: Verteilung der S100-Proteine innerhalb eines Tonsillenkarcinoms

Die Abbildung zeigt die Verteilung von 5 S100-Proteinen innerhalb eines Tonsillenkarcinoms. Dabei sind S100A8 (B), S100A9 (C), S100A10 (D) und S100A2 (F) fast ausschließlich im Tumorgewebe lokalisiert. S100A11 (E) ist sowohl im Tumor- als auch im Normalgewebe lokalisiert. (A) zeigt die HE-Färbung des Schnittes nach der MALDI-IMS-Messung.

Im Valleculla-Karcinom (HNC 3) zeigen S100A8 (10825 Da), S100A9 (13292 Da) und S100A10 (11204 Da) überwiegend eine Lokalisation im normalen Plattenepithel. Im epithelialen Tumoranteil konnte eine schwache Expression beobachtet werden (Abb. 22).

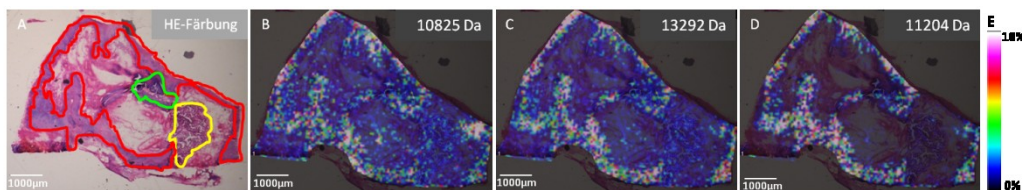


Abbildung 22: Verteilung der S100-Proteine innerhalb eines Valleculla-Karcinoms

Die Verteilung von 3 S100-Proteinen in einem HNC-Gewebeschnitt konnte mittels MALDI-IMS aufgezeigt werden. (A) stellt den HE-gefärbten Schnitt nach der MALDI-IMS-Messung dar. Rot: Normales Plattenepithel, grün: Plattenepithelkarcinom, gelb: Schleimdrüse S100A8 (B), S100A9 (C) und S100A10 (D) zeigen eine annähernd gleiche Verteilung im Plattenepithel.

Mittels Immunhistochemie wurden die Daten der MALDI-IMS-Analyse validiert. Dafür wurde exemplarisch die Proteinexpression von S100A8, S100A10 und S100A11 im Tonsillenkarcinom (HNC 245) (Abb. 23) und von S100A8 und S100A10 im Valleculla-Karcinom (HNC 3) (Abb. 24) untersucht. Die Immunhistochemie von S100A8 und S100A9 im Tonsillenkarcinom zeigt eine starke positive Reaktion im Tumorgewebe. S100A11 wird im Tumor nur sehr schwach exprimiert. Stroma und Nekrose zeigen hingegen eine starke Expression von S100A11 (Abb. 23).

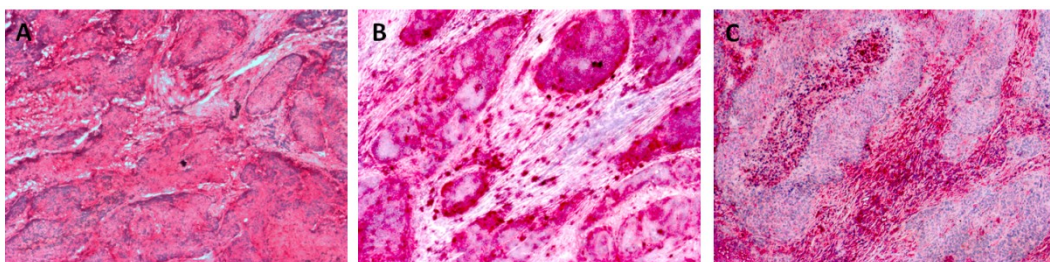


Abbildung 23: Immunhistochemie (IHC) für S100A8 (A), S100A9 (B) und S100A11 (C) am Tonsillenkarcinom

Die IHC für (A) S100A8 zeigt eine positive Reaktion im Tumor, vor allem an den Tumorrändern. (B) S100A9 wird überwiegend im Tumor und teilweise im Tumorstroma exprimiert. (C) S100A11 zeigt eine fast negative Reaktion im Tumor. Das Stroma und die Nekrose sind stark positiv gefärbt. Vergrößerung 5 x

Im Valleculla-Karzinom zeigt die immunhistochemische Färbung von S100A8 und S100A9 hauptsächlich im Plattenepithel eine positive Reaktion (Abb. 24).

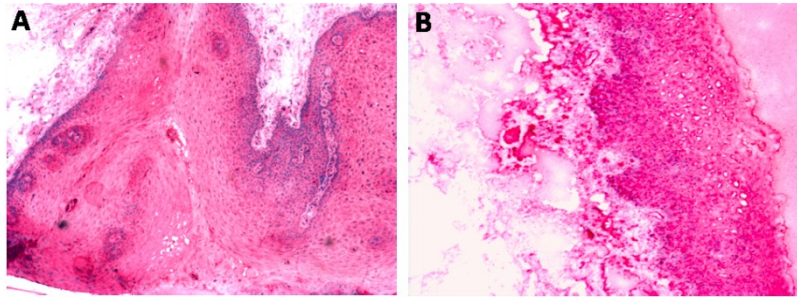


Abbildung 24: Immunhistochemie für S100A8 (A) und S100A9 (B) am Valleculla-Karzinom

Sowohl S100A8 (A) als auch S100A9 (B) zeigen eine positive Reaktion im Plattenepithel. Vergrößerung 5 x.

Somit bestätigt die Immunhistochemie die Daten der MALDI-IMS-Analyse. Die detektierten S100-Proteine zeigen eine annähernd gleiche Lokalisation im Gewebe auf.

4.1.6 Segmentierung von MALDI-IMS-Datensätzen

Mittels MALDI-IMS ist es möglich, das Proteinprofil eines Gewebeschnittes mit nur einer einzigen Messung zu erstellen. Man erhält einen Datensatz mit allen detektierten Signalen. Dieser Datensatz ist unheimlich komplex und es bedarf einer enormen Zeit- und Arbeitsleistung, um diese Daten auszuwerten. Um dieses zu vereinfachen, wurde eine Methode entwickelt, um die Datensätze auf ein Bild, eine sogenannte *segmentation map*, zu komprimieren. Die Methode wurde von Theodore Alexandrov (Center for Industrial Mathematics, University of Bremen, University of California, San Diego, USA) entwickelt und durchgeführt.

Abbildung 25 zeigt eine manuelle Auswertung einer MALDI-IMS-Messung eines HNC-Tumors. Es konnten Signale detektiert werden, die ausschließlich in der Schleimdrüse (gelbe Umrandung), im normalen Plattenepithel (rote Umrandung) oder im Plattenepithelkarzinom (grüne Umrandung) lokalisiert sind.

Im Vergleich dazu zeigt Abbildung 26 die Segmentierung der Gewebeprobe nach der MALDI-IMS-Messung. Es ist möglich viel mehr Signale in den einzelnen Segmenten zu detektieren.

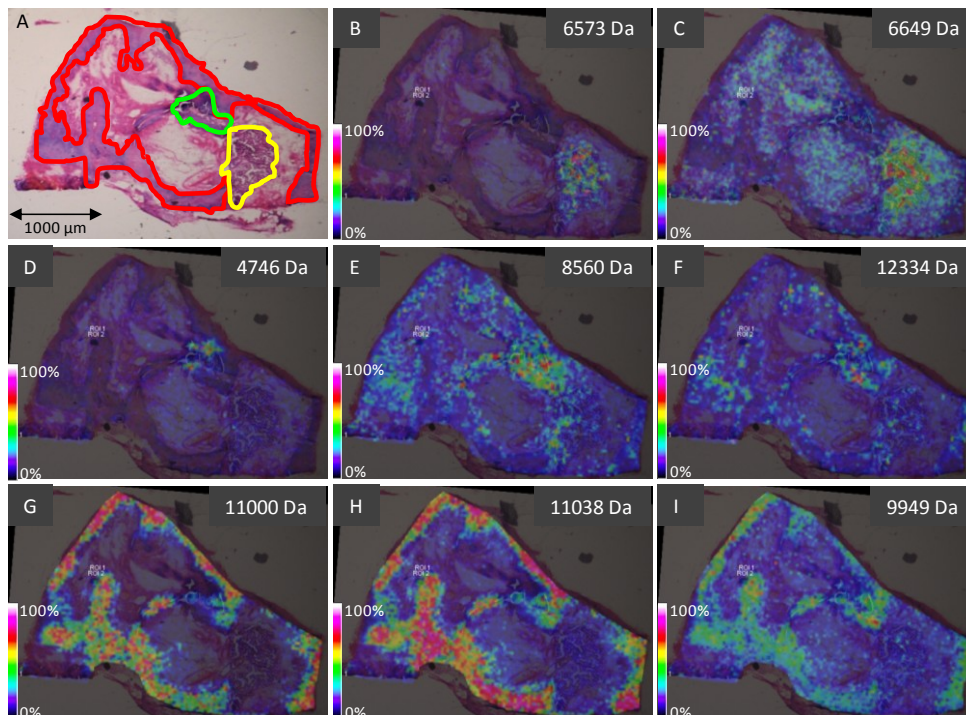


Abbildung 25: MALDI-IMS-Analyse einer Kopf-Hals-Tumor-Probe

Dargestellt sind verschiedene Signale, die innerhalb einer HNC-Gewebeprobe detektiert wurden. Einige Signale wurden nur in der Schleimdrüse (B, C), andere fast ausschließlich im Plattenepithelkarzinom (D, E, F) und wieder andere nur im gesunden Plattenepithel (G, H, I) detektiert. (A) zeigt den HE-gefärbten Schnitt nach der MALDI-IMS-Messung. Rot: Normales Plattenepithel, grün: Plattenepithelkarzinom, gelb: Schleimdrüse

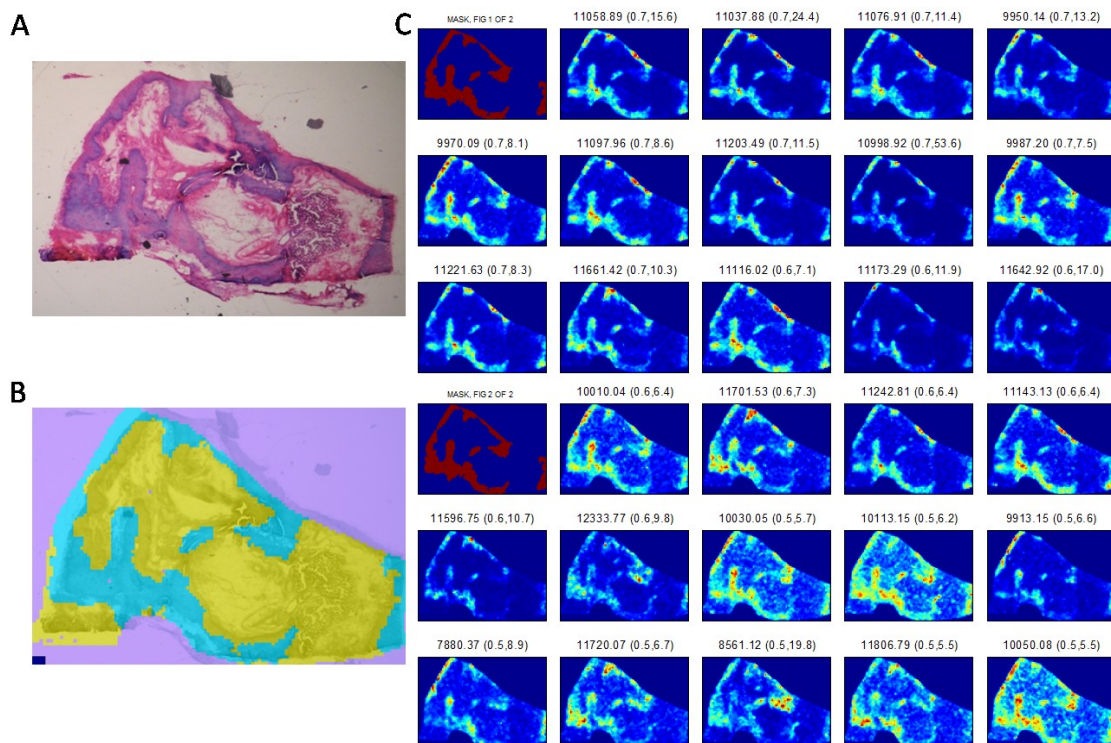


Abbildung 26: Segmentierung einer HNC-Gewebeprobe

Anhand einer Clusteranalyse ist es möglich, Segmentierungs-Masken zu erstellen. (A) HE-Färbung nach der MALDI-IMS-Messung. (B) Segmentierung mit 2 Clustern. Blau: epitheliales Segment, gelb: nicht-epitheliales Segment (C) detektierte Signale innerhalb der hellblauen Maske.

Je mehr Cluster in die Analyse einbezogen werden, umso mehr Segmente werden im Gewebe dargestellt. So können einzelne Segmente besser aufgeschlüsselt und so noch mehr Signale innerhalb dieser detektiert werden. Am oben benannten Beispiel kann durch weitere Segmentierung der Tumorbereich besser herauskristallisiert werden. Bei 2 Clustern wird das Gewebe in epitheliale und nicht-epitheliale Segmente aufgeschlüsselt. Der Tumorbereich wird bei dieser Clusteranalyse zum epithelialen Gewebereich dazugezählt. Erst mit einer weiteren Clusteranalyse nach Einberechnung von 10 Clustern trennt sich der Tumorbereich von den anderen epithelialen Bereichen. Je mehr Cluster mit einberechnet werden, desto mehr Tumorspezifische Signale können detektiert werden (Abb. 27 und Abb. 28).

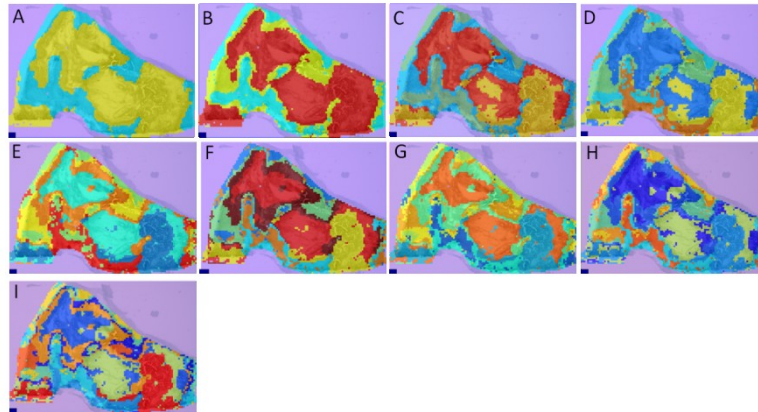


Abbildung 27: Segmentierung einer HNC-Gewebeprobe

Segmentation maps mit 2 (A), 3 (B), 4 (C), 5 (D), 6 (E), 7 (F), 8 (G), 9 (H) bzw. 10 (I) Clustern.

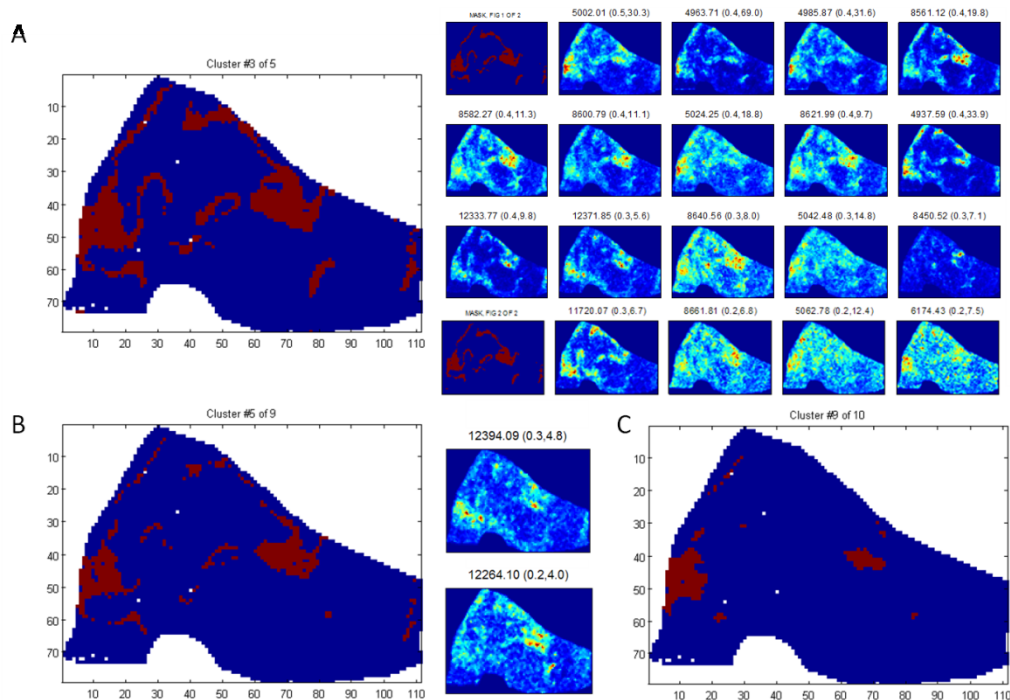


Abbildung 28: Segmentation maps des Tumorbereiches

Je mehr Cluster in die Segmentierung einberechnet werden, desto mehr kristallisiert sich der Tumorbereich heraus und desto mehr Tumorspezifische Signale können detektiert werden. (A) links: Cluster 3 von 5 zeigt den Bereich, der den Tumor mit einschließt, rechts: Signale, die fast ausschließlich in diesem Bereich detektiert werden. (B) links: Cluster 6 von 9 zeigt den Tumorbereich, rechts: weitere Signale, die nach dieser Aufschlüsselung im Tumorbereich detektiert werden. (C) Cluster 9 von 10 zeigt fast ausschließlich den Tumorbereich des Gewebeschnittes.

Für die Auswertung von MALDI-IMS-Daten von Tumorgewebe stellt die Segmentierung eine unheimliche Erleichterung dar. Tumorgewebe zeigt keine standardisierte, homogene Struktur, es ist ein extrem heterogenes Gewebe. Clustermethoden ermöglichen die bessere Interpretation dieser Tumor-Datensätze.

Am unten gezeigten Beispiel eines Tonsillenkarcinoms lässt sich der Tumor in 2 Hauptcluster einteilen. Im optischen Bild war diese Unterteilung morphologisch nicht erkennbar. Eine höhere optische Vergrößerung des Tumorbereiches im HE-Bild zeigt die heterogene Beschaffenheit des Tumors. Auch die *segmentation maps* zeigen diese Heterogenität innerhalb des Tumors, ohne jegliche Einbeziehung des histologischen Bildes (Abb. 29).

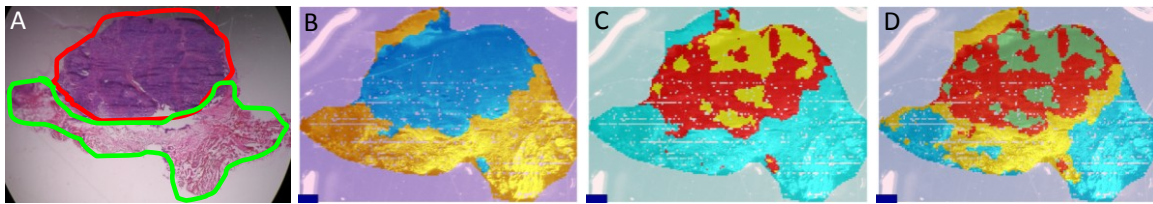


Abbildung 29: Segmentation maps eines Tonsillentumors

(A) HE-Färbung der Gewebeprobe nach der MALDI-IMS-Messung. Rot: Tumorgewebe, Grün: normales Plattenepithel. (B) – (D) *segmentation maps* mit 2, 3 bzw. 4 Clustern schlüsseln die Heterogenität des Tumorgewebes auf.

Auch in einem weiteren Beispiel wird mit Hilfe der *segmentation maps* die Heterogenität eines Gewebes aufgezeigt. Bei Einbeziehung von 2 Clustern wird das Gewebe nur in lymphatisches und epitheliales Gewebe aufgeteilt. Die weitere Aufschlüsselung der Cluster zeigt wie heterogen das lymphatische Gewebe ist und grenzt den Tumor vom epithelialen Gewebe ab (Abb. 30).

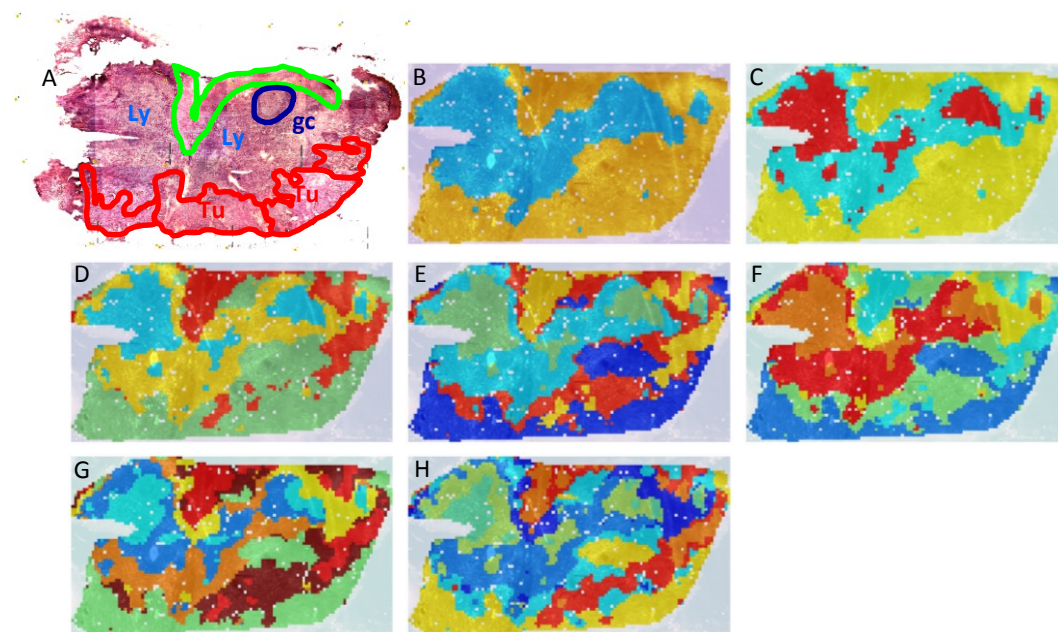


Abbildung 30: Segmentation maps eines Tonsillen Tumors

(A) HE-Färbung der Gewebeprobe nach der MALDI-IMS-Messung. Rot: Tumorgewebe, Grün: normales Plattenepithel, Ly: lymphatisches Gewebe mit Keimzentrum (gc). Die *segmentation maps* mit 2 (B), 3 (C), 4 (D), 5 (E), 6 (F), 7 (G) und 8 (H) Clustern schlüsseln die Heterogenität des Gewebes aus.

4.1.7 MALDI-IMS von humanen Zellen

Mit dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass mit nur einer MALDI-IMS-Messung ein Proteinprofil einer Gewebeprobe erstellt und die Morphologie des Gewebes wiedergegeben werden kann. Zusätzlich sollte getestet werden, ob es auch möglich ist, Zellen auf den Objektträgern für eine MALDI-IMS-Analyse zu kultivieren und anschließend ein Proteinprofil einer Zelllinie zu erstellen.

Dafür wurden verschiedene Zelllinien auf spezielle ITO-Objektträger mit Hilfe eines Deckgläschens ausgestrichen, bzw. 10 µl Zellsuspension pipettiert, mit DMEM-Medium aufgefüllt und über Nacht im Brutschrank kultiviert. Die Matrix wurde mit Hilfe des ImagePreps (Bruker) auf die Zellen gesprüht. Vor der MALDI-Messung wurde die Laserintensität auf 50 % gestellt und es wurden nur 10 Schüsse pro Spot eingestellt. Bei den sonst verwendeten 300 Laserschüssen pro Spot konnten keine ausreichend guten Spektren erzielt werden. Die Zellschicht wurde dabei komplett durchschossen.

Es konnte gezeigt werden, dass es mit Hilfe der MALDI-IMS-Technik möglich ist, auch ein Proteinprofil von Zelllinien zu erstellen. Die detektierten Signale zeigen wie erwartet eine homogene Verteilung über den gesamten Analysebereich (Abb. 31).

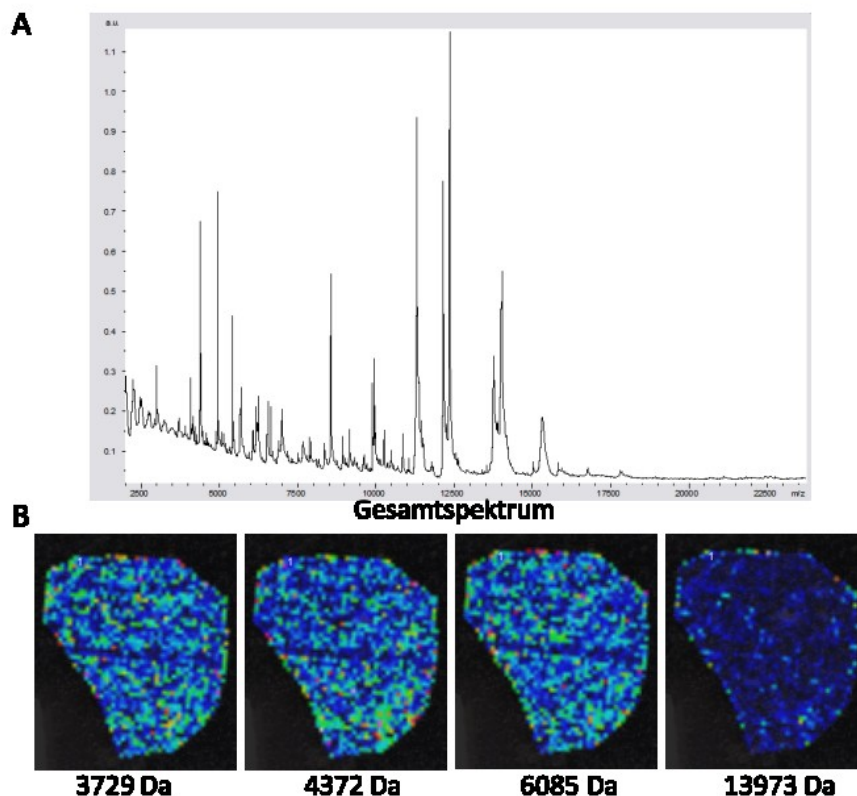


Abbildung 31: MALDI-IMS-Analyse von N2A-Zellen

(A) Zeigt das Gesamtspektrum von 3000 Da bis 30000 Da. (B) detektierte Signale zeigen eine homogene Verteilung im gesamten Analysebereich.

4.2 Funktionelle Charakterisierung von S100A8

Wie bereits im Abschnitt 4.1.3. gezeigt, konnte mittels einer Kombination aus MALDI-IMS, Mikrodissektion und SELDI-MS ein Signal innerhalb des Tumorgewebes von Kopf-Hals-Tumoren detektiert und mit Immunhistochemie genau im Gewebe lokalisiert werden. Dabei wurde gezeigt, dass dieses Protein an der Peripherie des epithelialen Tumors, vor allem an der Grenze zum

Tumorstroma, lokalisiert ist. Mittels Immundepletion und Immuncapturing (Abschnitt 4.1.4.) konnte dieses Protein als S100A8 identifiziert werden. Aufgrund der Lokalisation von S100A8 an der Peripherie des Tumorgewebes sollte S100A8 hinsichtlich des Metastasierungspotentials untersucht werden.

4.2.1 S100A8-exprimierende Zelllinien

Zunächst wurde getestet, welche Zelllinien S100A8 endogen exprimieren. Dazu wurden von 8 verschiedenen Zelllinien (U2OS, HaCaT, PE15, PE49, A431, HeLa, FaDu und SW480) Lysate hergestellt und diese auf die Expression von S100A8 mittels Western Blot überprüft. Dabei stellte sich heraus, dass keine von den getesteten Zelllinien S100A8 endogen exprimiert (Abb.32).

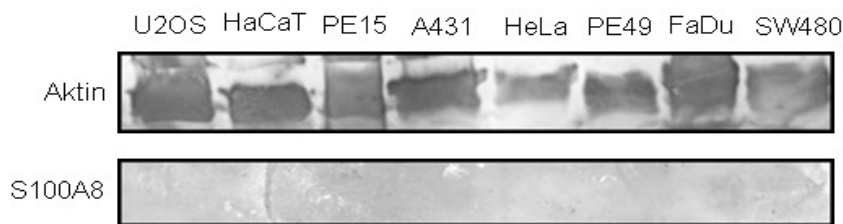


Abbildung 32: Untersuchung verschiedener Zelllinien auf die Expression von S100A8

Die Zellen wurden lysiert, 80 µg Protein pro Tasche auf ein 10 %iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen, entsprechend des Molekulargewichtes aufgetrennt und anschließend auf eine PVDF-Membran geblottet. Der Nachweis des Proteins erfolgte mit einem S100A8-spezifischen Antikörper. Als Ladekontrolle diente β-Aktin. Keine der getesteten Zelllinien exprimiert S100A8.

4.2.2 S100A8-Plasmid-Transformation in kompetente Bakterien und Transfektion in eukaryotische Zellen

Da S100A8 in keiner Zelllinie endogen exprimiert wird, musste das Protein über ein Plasmid in eukaryotische Zellen transfiziert werden.

Dafür wurden zunächst kompetente Bakterienzellen mit dem pVITRO-S100A8/A9-Plasmid transformiert und über Nacht bei 37 °C auf dem Schüttler kultiviert. Anschließend wurde das Plasmid über eine Midipräparation aufgereinigt, mit dem Transfektionsreagenz TurboFect (Fermentas) in eukaryotische Zellen transfiziert und die Effizienz im Western Blot ermittelt.

24 h nach der Transfektion konnte eine zufriedenstellende S100A8-Proteinkonzentration in den behandelten Zellen erreicht werden (Abb. 33). Auch S100A9 konnte in den pVITRO-S100A8/A9 transfizierten Zellen nachgewiesen werden. In Zellen, die mit einem unspezifischen gfp-Vektor transfiziert wurden, konnte weder ein Signal für S100A8 noch ein Signal für S100A9 detektiert werden. Da es sich hier um eine transiente Transfektion handelt, wird das Plasmid bei weiteren Zellteilungen nicht an die Tochterzellen weitergegeben. Somit kommt es zu einem „Herausverdünnen“ des Plasmids aus der Zellkultur. Aus diesem Grund wurden die Zellen für die weiteren S100A8/A9-basierenden Versuche nach 24 h geerntet und entsprechend analysiert.

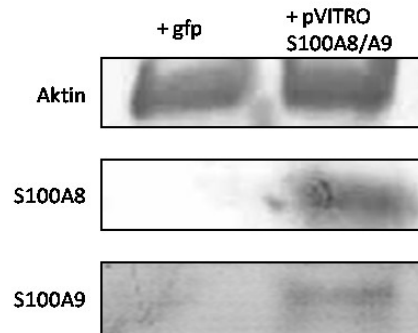


Abbildung 33: pVITRO-S100A8/A9-Transfektion in HaCaT-Keratinocyten

HaCaT-Zellen wurden mit dem pVITRO-S100A8/A9-Plasmid bzw. einem unspezifischen gfp-Vektor transfiziert und nach 24 h geerntet. Die Zellen wurden lysiert, die Proteine elektrophoretisch separiert und auf eine PVDF-Membran transferiert. Mit einem spezifischen Antikörper wurde S100A8 bzw. S100A9 im Western Blot nachgewiesen. Als Ladekontrolle diente β -Aktin. Nach der Transfektion mit dem spezifischen S100A8/A9-Plasmid war es möglich die Proteine in den Zellen zu detektieren. Im Vergleich dazu konnte in der unspezifischen gfp-Kontrolle S100A8 bzw. S100A9 nicht nachgewiesen werden.

4.2.3 Stimulation der Expression und Sekretion von S100A8/A9 mit CaCl_2

Die Gruppe um Nukui aus Japan konnte 2008 zeigen, dass in NHK-(*normal human keratinocytes*) Zellen sowohl die Expression als auch die Sekretion von S100A8 und S100A9 ins Medium mit Kalziumchlorid (CaCl_2) stimuliert werden kann [Nukui et al. 2008]. In unserem Labor sind die HaCaT-Keratinocyten, eine humane epitheliale, immortalisierte Zelllinie, gut etabliert. Im Folgenden sollte untersucht werden, ob die Expression und die Sekretion von S100A8/A9 auch bei diesen Keratinocyten mit CaCl_2 stimulierbar ist. Dafür wurden die Zellen mit verschiedenen Konzentrationen (10 mM, 5 mM, 1,5 mM, 0,5 mM, 0,03 mM und 0,01 mM) CaCl_2 behandelt und nach 24 h analysiert. Um die Proteinexpression zu ermitteln wurde das Zellpellet lysiert, die Proteine elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Um die Sekretion der Proteine ins Medium zu untersuchen, wurde dieses von den Zellen abgenommen, die darin enthaltenen Proteine über Gelelektrophorese aufgetrennt und im Western Blot analysiert.

Es zeigte sich, dass sich die Expression von S100A8 und S100A9 mit allen getesteten Konzentrationen CaCl_2 stimulieren lässt (Abb. 34). Jedoch war es nicht möglich die Sekretion der Proteine ins umgebende Medium anzuregen. Bei keiner getesteten CaCl_2 -Konzentration ließen sich S100A8 und S100A9 im Medium nachweisen.

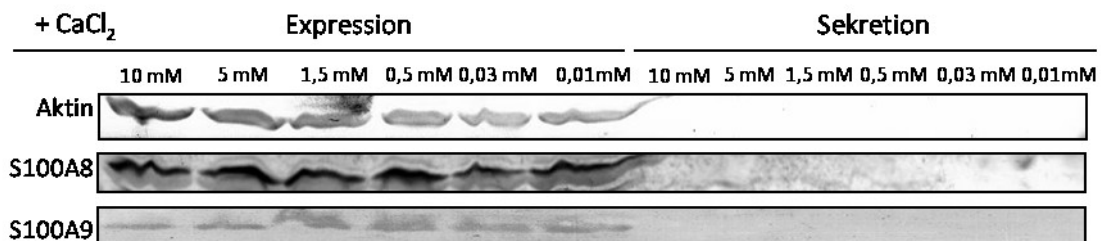


Abbildung 34: Stimulation der S100A8/A9 Expression und Sekretion durch CaCl_2 bei HaCaT-Keratinocyten

HaCaT-Zellen wurden mit verschiedenen CaCl_2 -Konzentrationen behandelt und nach 24 h geerntet. Um die Expression von S100A8/A9 zu untersuchen wurden die Zellen lysiert, um die Sekretion der Proteine zu analysieren wurde das Medium von den behandelten Zellen abgenommen. Anhand eines spezifischen Antikörpers wurde S100A8 bzw. S100A9 im Western Blot nachgewiesen. Als Ladenkontrolle wurde Aktin mitgeführt. Die Expression von S100A8/A9 konnte sowohl mit 10 mM, 5 mM, 1,5 mM als auch mit 0,03 mM und 0,01 mM CaCl_2 stimuliert werden. Jedoch konnte weder ein S100A8- noch ein S100A9-Signal im Überstand der Zellen detektiert werden.

Es wurde außerdem getestet, ob sich die Expression und Sekretion auch bei anderen Zellen mit CaCl_2 stimulieren lässt. Da S100A8 in der Peripherie von Kopf-Hals-Tumoren detektiert wurde, war es für diese Arbeit interessant, ob sich bei FaDu-Kopf-Hals-Tumor-Zellen die S100A8/A9-Proteinexpression und –sekretion stimulieren lässt. Dafür wurden FaDu-Zellen mit den entsprechenden CaCl_2 -Konzentrationen behandelt und nach 24 h analysiert.

Auch hier wurde gezeigt, dass sowohl mit sehr geringen als auch mit höheren CaCl_2 -Konzentrationen die Expression von S100A8 stimuliert werden kann. Jedoch war auch hier keine Stimulation der Sekretion des Proteins ins Medium möglich. Desweiteren konnte nur eine sehr geringe Expression von S100A9 bei FaDu-Zellen stimuliert werden (Abb. 35).

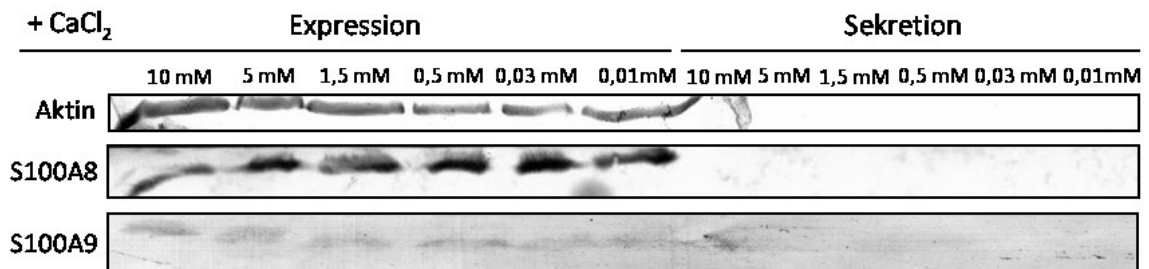


Abbildung 35: Stimulation der S100A8/A9 Expression und Sekretion durch CaCl_2 bei FaDu-HNC-Zellen

FaDu-Zellen wurden mit 10 mM CaCl_2 , 5 mM CaCl_2 , 1,5 mM CaCl_2 , 0,5 mM CaCl_2 , 0,03 mM CaCl_2 und 0,01 mM CaCl_2 stimuliert. Nach 24 h wurde zum einen das Medium von den Zellen abgenommen und zum anderen die Zellen geerntet. Das Zellpellet wurde lysiert. S100A8 und S100A9 wurden sowohl aus dem Medium als auch aus dem Lysat im Western Blot mit einem spezifischen Antikörper nachgewiesen. Als Ladekontrolle wurde Aktin mitgeführt. Die Expression von S100A8 konnte durch alle CaCl_2 -Konzentrationen stimuliert werden. Es konnte jedoch mit keiner CaCl_2 -Konzentration ein Signal für S100A8 im Überstand detektiert werden. Die Expression von S100A9 konnte nur sehr gering mit CaCl_2 stimuliert werden.

4.2.4 Lokalisation von S100A8 innerhalb der Zelle

S100A8 wurde im Rahmen dieser Arbeit in MALDI-IMS-Analysen (Abb. 14), einer Kombination aus Mikrodissektion und SELDI-MS (Abb. 16) und mit Immunhistochemie im Tumorbereich von Kopf-Hals-Tumoren und dort vor allem in der Peripherie dieser detektiert (Abb. 17). Somit konnte die Lokalisation des Proteins im Gewebe beschrieben werden. Im Folgenden sollte die exakte Lokalisation von S100A8 innerhalb der Zelle durch immunfluoreszenzbasierende Untersuchungen bestimmt werden. Dafür wurden HaCaT-Keratinocyten sowie FaDu-HNC-Zellen mit 5 mM CaCl_2 stimuliert und nach 24 h mittels Immunfluoreszenz gefärbt. Kontrollzellen blieben vor der Färbung unbehandelt.

Es zeigt sich, dass S100A8 erst nach der CaCl_2 -Stimulation exprimiert wird und dann vor allem innerhalb des Zellkerns detektiert werden kann. Sowohl bei HaCaT- (Abb. 36) als auch bei FaDu-Zellen (Abb. 37) konnten nach einer CaCl_2 -Stimulation deutliche Fozi im Zellkern beobachtet werden. Im Vergleich dazu wurde bei den unbehandelten Zellen kein spezifisches Signal für S100A8 detektiert.

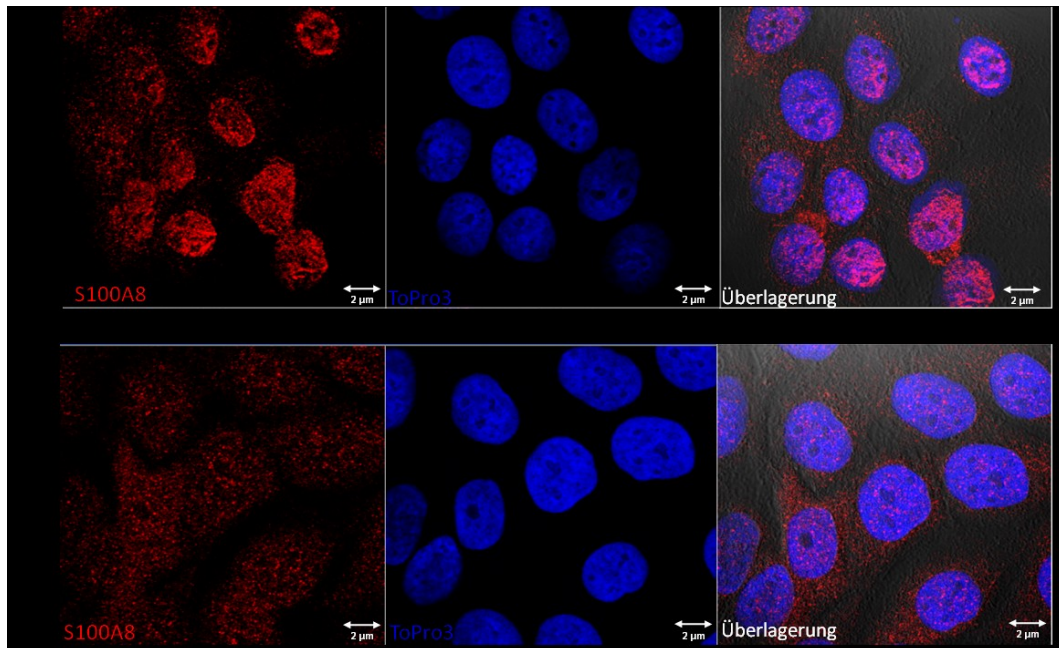


Abbildung 36: Lokalisation von S100A8 in fixierten HaCaT-Keratinocyten

S100A8 wurde mit einem anti-S100A8-Antikörper (rot) mittels Immunfluoreszenz angefärbt. Es zeigte sich eine nukleäre Lokalisation nach CaCl_2 -Stimulation (A). Unbehandelte HaCaT-Zellen zeigen nur eine unspezifische Färbung, was als Hintergrundrauschen gedeutet werden kann (B). Die DNA der Zellen wurde durch ToPro3 gefärbt (blau). Die Überlagerung setzt sich aus den Einzelbildern der S100A8, ToPro3 und dem Durchlicht der Zellen zusammen. Größenbalken: 2 μm

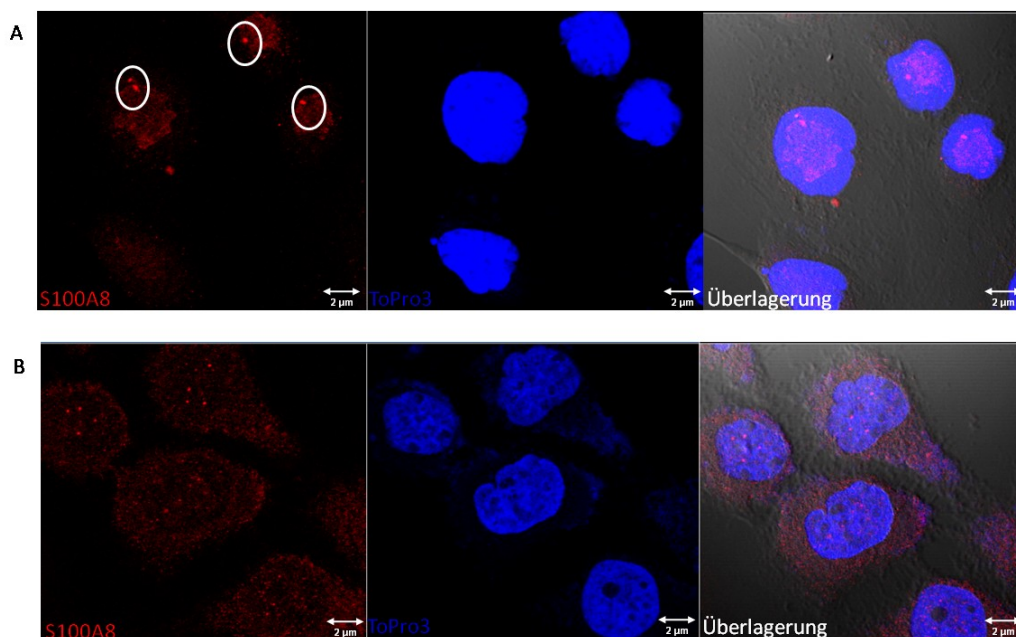


Abbildung 37: Lokalisation von S100A8 in fixierten FaDu-Zellen

Die Abbildung zeigt die Immunfluoreszenz-basierende Färbung von S100A8 in Methanol-Aceton-fixierten FaDu-Zellen. Mit einem spezifischen Antikörper wurde S100A8 innerhalb der Zellen lokalisiert. Dabei zeigen sich deutliche Fozi im Zellkern nach CaCl_2 -Stimulation (A). Unbehandelte Zellen weisen eine sehr schwache spezifische nukleäre Färbung auf (B). ToPro3 (blau) zeigt die Färbung der DNA. Die Überlagerung besteht aus S100A8, DNA und Durchlicht. Größenbalken: 2 μm .

4.2.5 Beteiligung von S100A8 an Invasions- und Migrationsprozessen

Wie bereits in den MALDI-IMS-Ergebnissen gezeigt wurde, konnte S100A8 an der invasiven Front des Tumors detektiert werden. Aufgrund dieser Beobachtung sollte untersucht werden, in wie weit S100A8 einen Einfluss auf die Metastasierung von Tumoren hat.

Um das Migrationsverhalten von S100A8 zu bestimmen, wurde ein Wundheilungsassay, auch Scratch-Assay genannt, durchgeführt. Dabei wurde konfluenten, S100A8/A9- bzw. gfp-transfizierten Zellen mit einer sterilen 1 ml-Pipettenspitze ein sogenannter „Scratch“ zugeführt und das anschließende Überwachsen der freien Fläche im Zellrasen über mehrere Tage hinweg beobachtet und fotografiert.

Dabei konnte gezeigt werden, dass FaDu-Zellen, die mit einem spezifischen S100A8/A9-Plasmid transfiziert wurden, die gesetzte Wunde im Zellrasen innerhalb einer Woche komplett schließen. Hingegen konnten FaDu-Zellen, die mit einem unspezifischen gfp-Kontrollplasmid transfiziert wurden, in diese Lücke im Zellrasen nicht einwandern (Abb. 38).

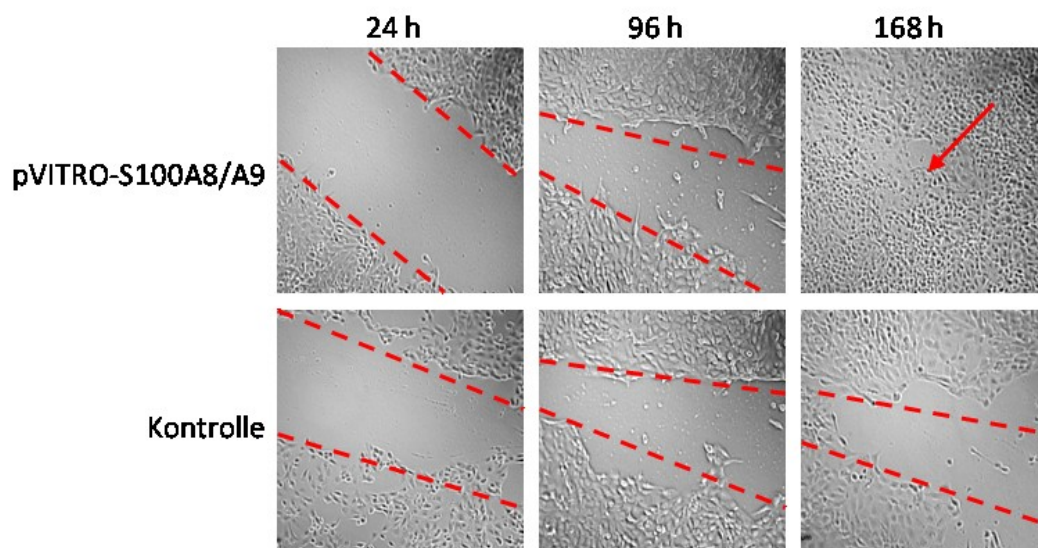


Abbildung 38: Migrationstest mittels Scratch-Assay mit FaDu Zellen

In einen konfluenten Monolayer von S100A8/A9- bzw. gfp-transfizierten FaDu-HNC-Zellen wurde eine Wunde gekratzt und das Zuwachsen dieser beobachtet. Zellen, die mit einem spezifischen S100A8/A9-Plasmid transfiziert wurden, konnten die Wunde im Zellrasen nach 7 Tagen vollständig schließen (obere Reihe). Im Vergleich dazu, konnten die gfp-transfizierten Kontrollzellen die Wunde in dieser Zeit nicht schließen (untere Reihe). Die roten Markerlinien zeigen den gesetzten Scratch, der Pfeil symbolisiert die geschlossene Wunde.

Der Wundheilungsassay wurde auch mit HaCaT-Keratinocyten durchgeführt. Auch hier zeigte sich, dass S100A8/A9-transfizierte Zellen ein höheres Potential als die Kontrollzellen haben die Wunde im Zellrasen zu schließen (Abb.39). Nach 96 h konnten die pVITRO-S100A8/A9 transfizierten Zellen den „Scratch“ fast vollständig schließen.

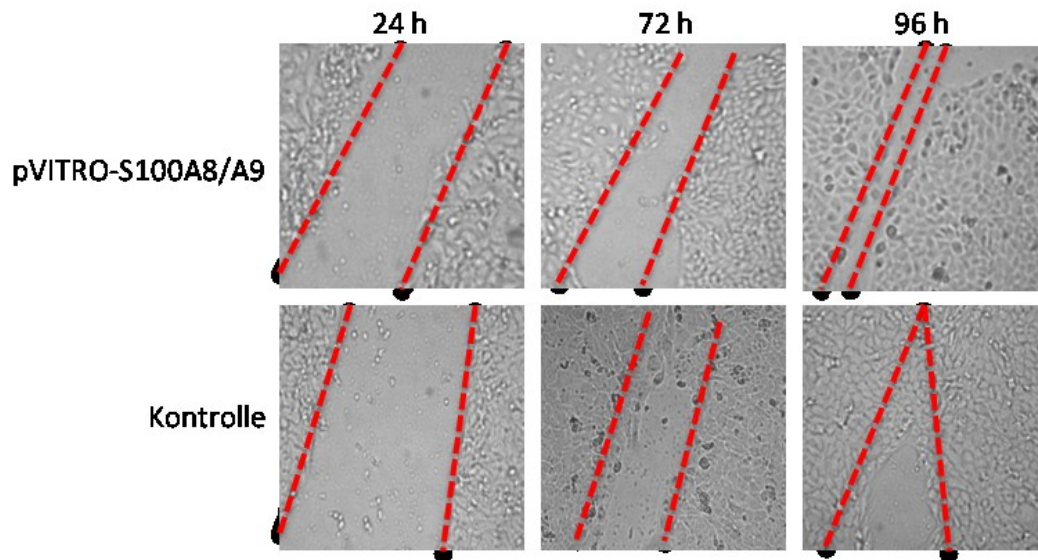


Abbildung 39: Migrationstest mittels Scratch-Assay

Scratch-Assay von pVITRO-S100A8/A9- bzw. gfp-transfizierten HaCaT-Keratinocyten. Zellen, die das S100A8/A9-Plasmid tragen (obere Reihe), zeigen, im Vergleich zur Kontrolle (untere Reihe), ein beschleunigtes Zuwachsen der im Zellrasen gesetzten Wunde. Die roten Linien markieren die gesetzte Wunde im Zellrasen.

Mit Hilfe des Scratch-Assay konnte gezeigt werden, dass Zellen, denen S100A8/A9 über ein Plasmid zugeführt wurde, ein höheres Migrationsverhalten im Vergleich zu den Kontrollzellen zeigen. Allerdings ist der Unterschied zwischen S100A8/A9-tragenden Zellen und den Kontrollzellen nur bei den FaDu-Zellen signifikant. Die Ergebnisse der HaCaT-Zellen sind im Vergleich zu denen der FaDu-Zellen weniger aussagekräftig.

Um das Migrationsverhalten pVITRO-S100A8/A9-transfizierter Zellen zu quantifizieren und zusätzlich das Invasionspotential zu untersuchen, wurden sogenannte Boyden-Kammer-Assays durchgeführt. Diese Kammern bestehen aus zwei Kompartimenten, die durch einen Filter (Migrationsassay) oder einen Matrigel-beschichteten Filter, welcher als Basalmembranäquivalent dient (Invasionsassay), getrennt sind. Der Test beruht auf Chemotaxis, das entsprechende Chemoattraktans wurde in das untere Kompartiment der Kammern eingefüllt, wodurch die Zellen zur Wanderung angeregt werden. In den oberen Teil der Kammern wurden die transfizierten Zellen gegeben und der Ansatz für 22 h bei 37 °C kultiviert. Anschließend wurden die gewanderten Zellen auf der Filterunterseite fixiert, gefärbt und unter dem Mikroskop ausgezählt.

Im Migrationsassay konnte gezeigt werden, dass sowohl mehr pVITRO-S100A8/A9-transfizierte FaDu- als auch HaCaT-Zellen durch den Filter der Boyden-Kammer gewandert sind als gfp-transfizierte Kontrollzellen. Somit zeigen S100A8/A9 transfizierte Zellen ein höheres Migrationsverhalten als Zellen ohne S100A8/A9 (Abb. 40).

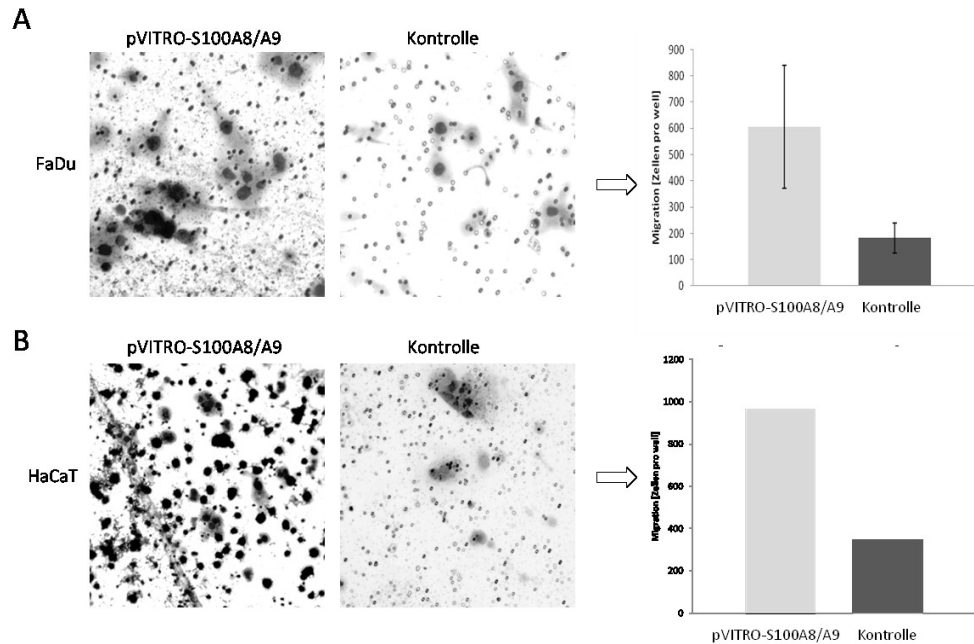


Abbildung 40: Bestimmung des Migrationspotentials von S100A8/A9 in FaDu-Zellen und HaCaT-Keratinocyten mittels Boyden-Kammer

Dargestellt sind die durch den Filter der Boyden-Kammer gewanderten und gefärbten FaDu-Zellen (A) und HaCaT-Keratinocyten (B). Zellen, die mit dem pVITRO-S100A8/A9 Plasmid transfiziert wurden, zeigen ein höheres Migrationspotential verglichen mit den gfp-transfizierten Kontrollzellen.

Zusätzlich wurde der Einfluss von S100A8/A9 auf das Invasionsverhalten der Zellen analysiert. Sowohl FaDu-Zellen als auch HaCaT-Keratinocyten, die mit S100A8/A9 transfiziert wurden, zeigen im Vergleich zur Kontrolle eine erhöhte Fähigkeit durch das Matrigel der Boyden Kammern, welches als Basalmembran-Äquivalent fungiert, zu invadieren (Abb. 41).

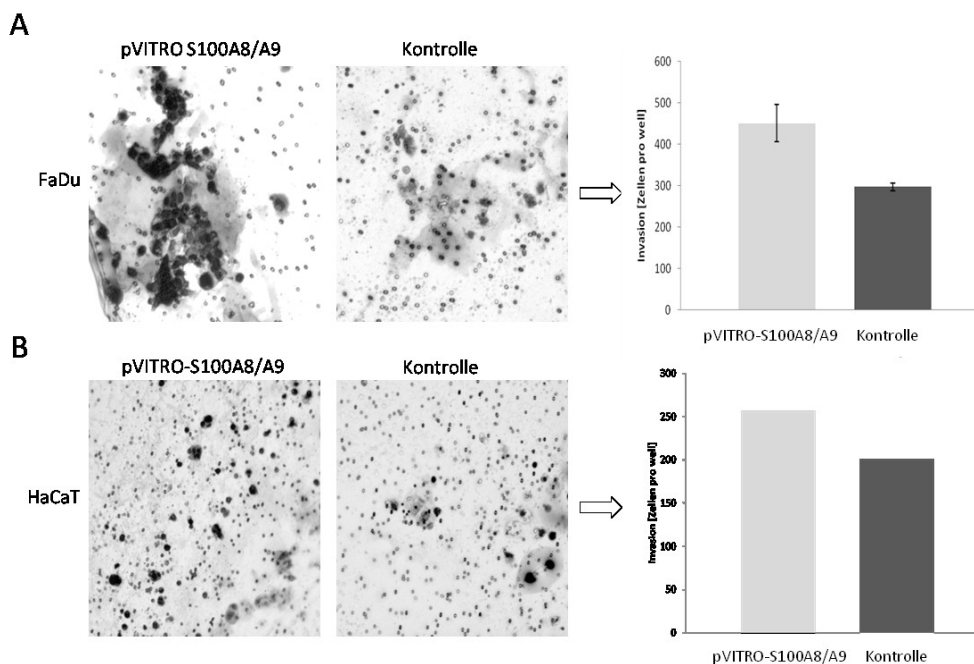


Abbildung 41: Bestimmung des Invasionspotentials von S100A8/A9 in FaDu und HaCaT-Keratinocyten mittels Boyden-Kammer

Die mit S100A8/A9 transfizierten FaDu (A)- und HaCaT-Zellen (B) zeigten im Vergleich zu den gfp-transfizierten Kontrollzellen ein erhöhtes Invasionsvermögen auf.

4.2.6 Colony Forming Assay

Um die Überlebensrate von Zellen, die mit dem pVITRO-S100A8/A9-Plasmid transfiziert wurden, mit Kontrollzellen zu vergleichen, wurde ein *colony forming assay* durchgeführt. Dabei wird die Anzahl der teilungsfähigen Zellen nach S100A8/A9-Transfektion bzw. von Kontrollzellen bestimmt.

Es wurden 1×10^4 S100A8/A9- bzw. gfp-transfizierte FaDu-Zellen ausgesät und über 10 Tage hinweg kultiviert, bis sich deutliche Kolonien gebildet haben. Nach Fixierung und Hämalaun-Färbung der Zellen wurden die Kolonien ausgezählt. Es zeigt sich, dass eine S100A8/A9-Plasmid-Transfektion zu einer signifikanten Steigerung der Zellproliferation führt. Im Vergleich zu gfp-transfizierten Kontrollzellen zeigen S100A8/A9-transfizierte Zellen eine fast zweifache Steigerung der Koloniebildung (Abb. 42).

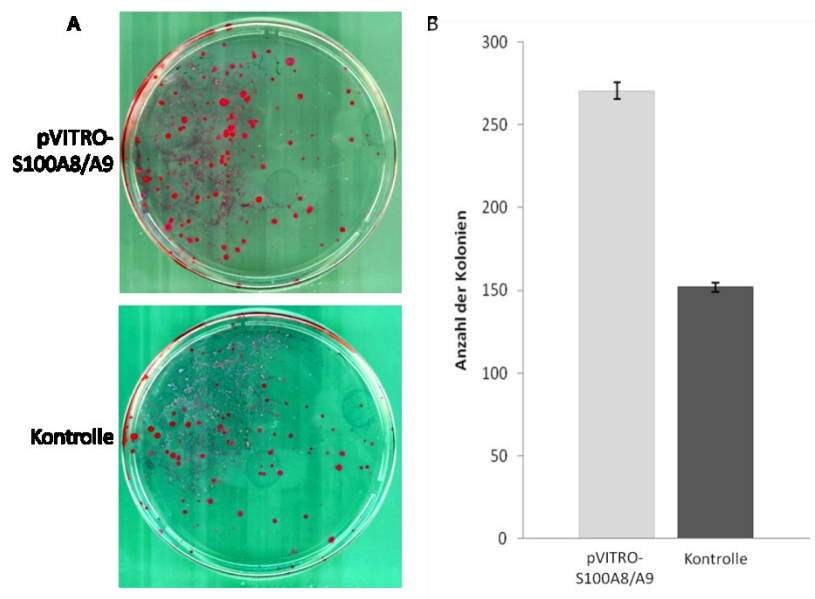


Abbildung 42: S100A8/A9 zeigt eine gesteigerte Proliferationsrate bei FaDu-HNC-Zellen

Es wurden 1×10^4 transfizierte Zellen ausgesät und über 10 Tage die Koloniebildung beobachtet. Anschließend wurden die Zellen fixiert, gefärbt und die Kolonien ausgezählt. A: Repräsentative Ergebnisse des Versuchsansatzes. B: Grafische Darstellung der ausgezählten Kolonien. pVITRO-S100A8/A9-transfizierte Zellen zeigen eine fast zweifach gesteigerte Proliferationsrate im Vergleich zu Kontrollzellen.

Auch bei HaCaT-Keratinocyten wurde der Einfluss von S100A8/A9 auf die Überlebensrate der Zellen getestet. Hierbei konnte kein signifikanter Unterschied in der Koloniebildung zwischen S100A8/A9-transfizierten und gfp-transfizierten HaCaT-Zellen festgestellt werden (Abb. 43).

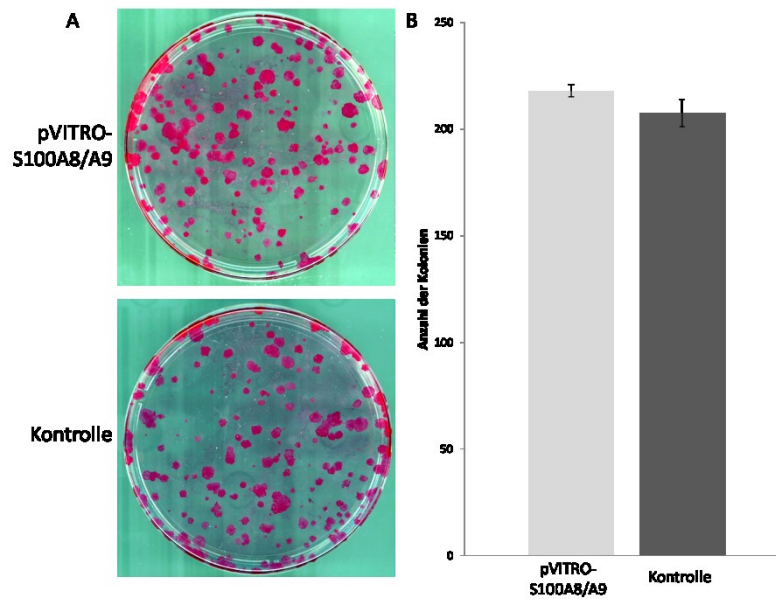


Abbildung 43: S100A8/A9 hat keinen Einfluss auf die Proliferationsrate von HaCaT-Keratinozyten

Dargestellt sind die repräsentativen Ergebnisse des Versuchsansatzes (A) und die grafische Darstellung der ausgezählten Kolonien (B). Der *Colony forming Assay* zeigt keinen signifikanten Unterschied in der Proliferationsrate von pVITRO-S100A8/A9-transfizierten Zellen und den gfp-transfizierten Kontrollzellen

4.2.7 Untersuchung des Einflusses von S100A8 auf Metastase-involvierter Gene

Um den Einfluss von S100A8 auf Gene, die die Tumorprogression beeinflussen, zu untersuchen, wurden die Expressionsprofile von Metastase-involvierten Genen untersucht. Mit Hilfe der 44 K Microarrays von Agilent konnte das Expressionslevel von > 41.000 Transkripten untersucht werden. Für die Auswertung wurden nur Metastase-involvierte Gene betrachtet. Dabei wurde die Expression von Genen berücksichtigt die die Zell-Zell-Adhäsion, den Zellzyklus sowie das Zellwachstum und die Zellproliferation beeinflussen. Desweiteren wurde die Expression von Genen betrachtet die für Matrixmetalloproteinasen und dessen Inhibitoren, Transkriptionsfaktoren und Regulatoren kodieren.

Es wurden sowohl FaDu-HNC-Zellen als auch HaCaT-Keratinozyten mit dem pVITRO-S100A8/A9-Plasmid transfiziert, geerntet und die Gesamt-RNA isoliert. Diese wurde anschließend in cDNA umgeschrieben, mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert und auf einen 44 K Microarray hybridisiert.

Die Expressions-Analyse zeigt 58 Metastase-involvierte Gene, die bei S100A8/A9-transfizierten FaDu-HNC-Zellen im Vergleich zu den gfp-transfizierten Kontrollzellen hoch- bzw. herunterreguliert waren (Tab. 2). Diese differentiell exprimierten Gene wiesen einen Fold Change > 10 auf. 44 Gene sind in S100A8/A9-transfizierten Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen deutlich hochreguliert. Davon sind 14 Gene (z.B. CXCR4, CDH11, CDH19 und TGFβ3) in S100A8/A9-exprimierenden Zellen mehr als 100-fach überexprimiert. 12 Gene, darunter MMP2, MMP3, MCAM und CXCL12 haben einen Fold Change von 50 bis 100, das heißt diese Gene sind in S100A8/A9-tansfizierten Zellen 50- bis 100-fach überexprimiert. 18 Gene, darunter, MMP10, MMP11 und TGFβ2 zeigen einen Fold Change von 10 bis 50. 14 Gene (z.B. CDH1 und RHOC) sind in den S100A8/A9-transfizierten Zellen mit einem Fold Change zwischen 10 und 40 deutlich herunterreguliert.

Tabelle 2: Expressionsprofil der Metastase-involvierten Gene nach S100A8/A9-Transfektion bei FaDu-HNC-Zellen

Die Tabelle enthält die potentiell durch S100A8/A9 regulierten Gene in FaDu-Zellen, die durch einen 44 K Microarray von Agilent ermittelt wurden. Verglichen wurde die Expression der Gene in S100A8/A9-transfizierten Zellen mit gfp-transfizierten Kontrollzellen. (+) bedeutet, das Gen ist in S100A8/A9-transfizierten Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen hochreguliert, (-) bedeutet, das Gen ist in S100A8/A9-transfizierten Zellen im Vergleich zu den gfp-transfizierten Zellen herunterreguliert. Fold Change gibt den Wert der Expression an.

Gen-Symbol	Beschreibung	Gen-Regulation	Fold Change (Kontrolle gegen S100A8/A9)
GNRH2	gonadotropin-releasing hormone 2	+	10,043976
APC	adenomatous polyposis coli	+	10,183346
TWIST1	twist homolog 1	+	10,292728
IL8RBP	interleukin 8 receptor, beta pseudogene	+	10,950778
CDH12	cadherin 12, type 2 (N-cadherin 2)	+	11,084409
TGFβ 2	transforming growth factor, beta 2	+	12,379347
MMP10	matrix metalloproteinase 10 (stromelysin 2)	+	13,875794
MMP13	matrix metalloproteinase 13 (collagenase 3)	+	16,159176
ITGB3	integrin, beta 3	+	17,568872
TRPM1	transient receptor potential cation channel, subfamily M, member 1	+	19,930513
MMP11	matrix metalloproteinase 11 (stromelysin 3)	+	23,402506
FN1	fibronectin 1	+	25,898106
PCDH8	protocadherin 8	+	28,304516
NME4	non-metastatic cells 4, protein	+	28,641884
ETV6	ets variant 6	+	30,31522
TGFβ1	transforming growth factor, beta-induced	+	40,518436
MGAT5	mannosyl (alpha-1,6-)-glycoprotein beta-1,6-N-acetylglucosaminyltransferase, isozyme B	+	42,10428
MTSS1	metastasis suppressor 1	+	49,930717
TIMP4	TIMP metalloproteinase inhibitor 4	+	52,44458
FAT3	FAT tumor suppressor homolog 3	+	55,949936
MMP2	matrix metalloproteinase 24 (membrane-inserted)	+	55,959038
SSTR2	somatostatin receptor 2	+	58,99677

4 Ergebnisse

MYCL1	v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog 1, lung carcinoma derived	+	59,97909
CXCL12	chemokine (C-X-C motif) ligand 12	+	64,342
MCAM	melanoma cell adhesion molecule	+	70,28824
NR4A3	nuclear receptor subfamily 4, group A, member 3	+	70,37211
FAT2	FAT tumor suppressor homolog 2	+	80,06136
MMP3	matrix metalloproteinase 3 (stromelysin 1, progelatinase)	+	87,58063
CDH6	cadherin 6, type 2, K-cadherin (fetal kidney)	+	92,086426
DCC	deleted in colorectal carcinoma	+	98,72639
CDH19	cadherin 19, type 2	+	105,30134
CXCR4	chemokine (C-X-C motif) receptor 4	+	123,87065
TSHR	thyroid stimulating hormone receptor	+	124,823074
IL8RB	interleukin 8 receptor, beta	+	150,94841
RORB	RAR-related orphan receptor B	+	157,79593
HGF	hepatocyte growth factor (hepatopoietin A; scatter factor)	+	173,93808
MYC	v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog	+	194,30466
GZMA	granzyme A (granzyme 1, cytotoxic T-lymphocyte-associated serine esterase 3)	+	203,16394
TGFβ 3	transforming growth factor, beta 3	+	228,04077
CDH8	cadherin 8, type 2	+	243,11212
CDH11	cadherin 11, type 2, OB-cadherin (osteoblast)	+	266,54285
IGF1	insulin-like growth factor 1 (somatomedin C)	+	274,3962
CST7	cystatin F (leukocystatin)	+	404,49548
FLT4	fms-related tyrosine kinase 4	+	547,4196
TPBG	trophoblast glycoprotein	-	10,624719
PNN	pinin, desmosome associated protein	-	11,457368
MTA1	metastasis associated 1	-	12,065624
IL1B	interleukin 1, beta	-	13,85917
VEGFC	vascular endothelial growth factor C	-	15,150267
CTNNA1	catenin (cadherin-associated protein), alpha 1, 102kDa	-	15,81721
CAV1	caveolin 1, caveolae protein, 22kDa	-	17,194181

CDH1	cadherin 1, type 1, E-cadherin (epithelial)	-	17,960464
NF2	neurofibromin 2 (merlin)	-	18,66483
CTBP1	C-terminal binding protein 1	-	20,808702
RHOC	ras homolog gene family, member C	-	21,519651
HTATIP2	HIV-1 Tat interactive protein 2	-	21,580435
SYK	spleen tyrosine kinase	-	27,75014
VEGFA	vascular endothelial growth factor A	-	39,834713

Die Expressions-Analyse Metastase-involvierter Gene in S100A8/A9-transfizierten HaCaT-Keratinocyten zeigt 61 Gene die im Vergleich zu den Kontrollzellen hoch- bzw. herunterreguliert waren (Tab. 3). 48 Gene zeigen eine Überexpression, wovon 28 Gene (CDH6, CDH11, CDH19, TGF β 3, CXCR4, CXCL12 u.a.) einen Fold Change über 100 aufweisen und somit eine deutliche Überexpression zeigen. 6 Gene, darunter CDH8 und MCAM sind 50- bis 100-fach und 14 Gene (MMP11, TGF β 2 u.a.) sind 10- bis 50-fach in S100A8/A9-transfizierten Zellen überexprimiert. 13 Gene, darunter CHD1 und RHOC sind in den S100A8/A9-transfizierten Zellen mit einem Fold Change von 10 bis 50 herunterreguliert, das heißt sie sind in den Kontrollzellen 10- bis 50-fach überexprimiert.

Tabelle 3: Genexpressions-Analyse Metastase-involvierter Gene nach S100A8/A9-Transfektion bei HaCaT-Keratinocyten

Aufgelistet sind sowohl die Gene, die in S100A8/A9-transfizierten Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen hochreguliert sind (+) als auch die Gene, die in S100A8/A9-transfizierten Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen herunterreguliert sind (-). Der Fold Change gibt den Wert der Expression an.

Gen-Symbol	Beschreibung	Gen-Regulation	Fold Change (Kontrolle gegen S100A8/A9)
RB1	retinoblastoma 1	+	11,321406
MDM2	Mdm2 p53 binding protein homolog	+	13,159518
TIAM2	T-cell lymphoma invasion and metastasis 2	+	13,798285
TIMP4	TIMP metalloproteinase inhibitor 4	+	17,364473
MYC	v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog	+	18,036587
FGFR4	fibroblast growth factor receptor 4	+	18,234667
KISS1	KiSS-1 metastasis-suppressor	+	21,847418
CTNNB1	catenin (cadherin-associated protein), beta 1	+	28,50033
GNRH1	gonadotropin-releasing hormone 1	+	30,48805
TGF β 2	transforming growth factor, beta 2	+	34,183388
MMP11	matrix metalloproteinase 11 (stromelysin 3)	+	38,494884
MTSS1	metastasis suppressor 1	+	38,65349

4 Ergebnisse

SMAD2	SMAD family member 2	+	40,93199
FAT3	FAT tumor suppressor homolog 3	+	47,11461
CDH8	cadherin 8	+	53,440567
MGAT5B	mannosyl (alpha-1,6-)-glycoprotein beta-1,6-N-acetyl-glucosaminyltransferase, isozyme B	+	55,71195
TGFBI	transforming growth factor, beta-induced	+	61,063732
MYCL1	v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog 1	+	75,58274
IL8RBP	interleukin 8 receptor, beta pseudogene	+	79,06278
MCAM	melanoma cell adhesion molecule	+	87,055405
PTP4A3	protein tyrosine phosphatase type IVA, member 3	+	102,421936
RECK	reversion-inducing-cysteine-rich protein with kazal motifs	+	116,09679
TRPM1	transient receptor potential cation channel, subfamily M, member 1	+	152,80077
SSTR2	somatostatin receptor 2	+	180,52211
MMP3	matrix metalloproteinase 3 (stromelysin 1, progelatinase)	+	234,96387
CXCR4	chemokine (C-X-C motif) receptor 4	+	267,38217
FLT4	fms-related tyrosine kinase 4	+	286,3365
CDH12	cadherin 12, type 2 (N-cadherin 2)	+	303,3374
PCDH8	protocadherin 8	+	311,1245
APC	adenomatous polyposis coli	+	428,24493
NR4A3	nuclear receptor subfamily 4, group A, member 3	+	463,83032
CDH6	cadherin 6, type 2, K-cadherin (fetal kidney)	+	526,5592
FN1	fibronectin 1	+	552,0905
CST7	cystatin F (leukocystatin)	+	587,38403
TWIST1	twist homolog 1	+	605,35803
MGAT5	mannosyl (alpha-1,6-)-glycoprotein beta-1,6-N-acetyl-glucosaminyltransferase	+	611,3132
TSHR	thyroid stimulating hormone receptor	+	621,2934
RORB	RAR-related orphan receptor B	+	637,0841
ITGB3	integrin, beta 3	+	668,0304
CDH19	cadherin 19, type 2	+	680,292

CXCL12	chemokine (C-X-C motif) ligand 12 (stromal cell-derived factor 1)	+	698,94666
CDH11	cadherin 11, type 2, OB-cadherin (osteoblast)	+	701,51935
DCC	deleted in colorectal carcinoma	+	724,84454
IL8RB	interleukin 8 receptor, beta	+	725,18
HGF	hepatocyte growth factor (hepapoietin A; scatter factor)	+	725,4749
GZMA	granzyme A (granzyme 1, cytotoxic T-lymphocyte-associated serine esterase 3)	+	749,0879
IGF1	insulin-like growth factor 1 (somatomedin C)	+	753,18726
TGFβ 3	transforming growth factor, beta 3	+	919,9461
BRMS1	breast cancer metastasis suppressor 1	-	11,096821
HDAC1	histone deacetylase 1	-	11,496979
MTA1	metastasis associated 1	-	13,806533
VEGFB	vascular endothelial growth factor B	-	14,296719
METAP2	methionyl aminopeptidase 2	-	14,509796
SERPINB5	serpin peptidase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 5	-	18,249693
CDKN2A	cyclin-dependent kinase inhibitor 2A	-	18,511282
CDH1	cadherin 1, type 1, E-cadherin (epithelial)	-	19,10982
CD44	CD44 molecule	-	26,003107
RHOC	ras homolog gene family, member C	-	28,286924
CAV1	caveolin 1, caveolae protein	-	35,487724
NME1	non-metastatic cells 1, protein (NM23A)	-	39,75043
NME2	non-metastatic cells 2, protein (NM23B)	-	51,577473

Die Expressionsanalysen der FaDu- und HaCaT-Zellen zeigen die gleichen Ergebnisse. Nach S100A8/A9-Transfektion sind die gleichen Gene hoch- bzw. herunterreguliert im Vergleich zu den Kontrollzellen.

4.3 Funktionelle Charakterisierung von Annexin A5 hinsichtlich des Proliferations- und Invasionspotentials

In meiner vorangegangenen Diplomarbeit wurde das Protein Annexin A5 näher charakterisiert. In früheren Studien der Arbeitsgruppe CUCA (Core Unit Chip Application) konnte das Protein mittels ProteinChip Technologie an der invasiven Front von Kopf-Hals-Tumoren identifiziert werden [Melle et al. 2003]. Das Protein lag dort signifikant hochreguliert vor, so dass angenommen werden konnte, dass Annexin A5 an der Invasion eines Tumors beteiligt sein könnte. Diese Annahme wurde in meiner

Diplomarbeit bestätigt [Wehder 2008]. Mit Hilfe von Boyden-Kammer-Assays konnte Annexin A5 eine Rolle in Migrations- und Invasionsprozessen zugeschrieben werden (Abb. 44).

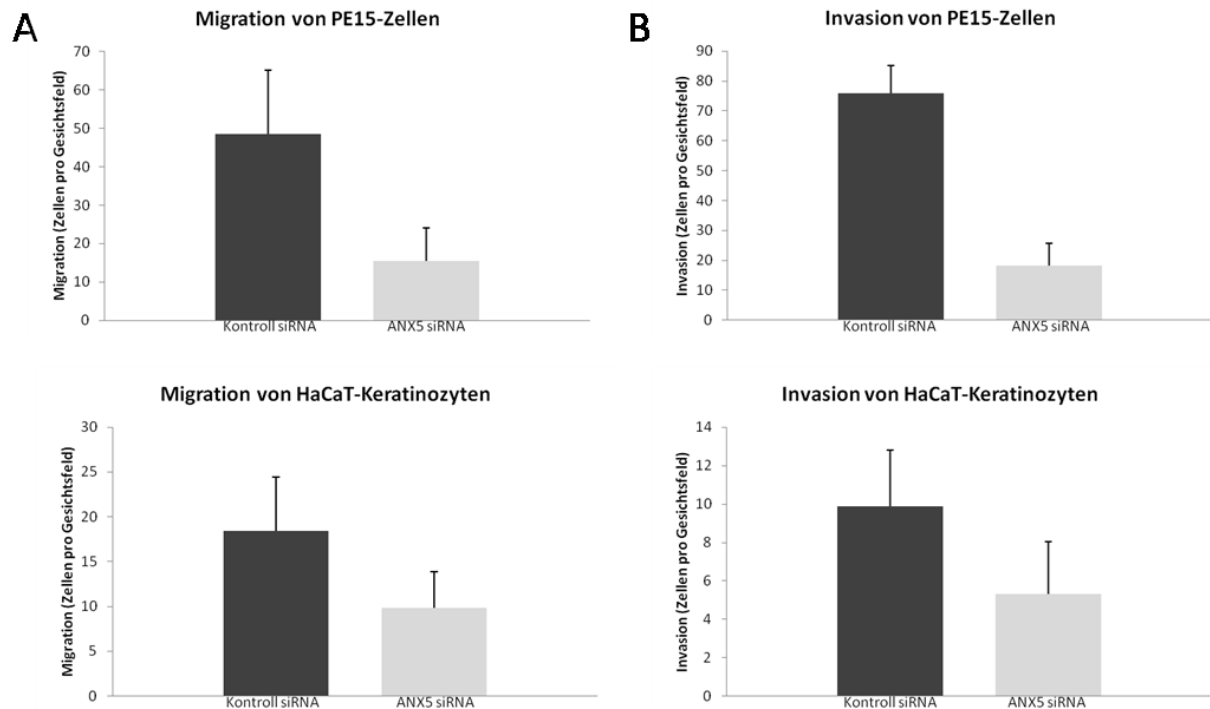


Abbildung 44: Analyse des Migrations- und Invasionspotentials von Annexin A5

Bestimmung des Migrations- (A) und Invasionspotentials (B) von Annexin A5 (ANX5) in PE15-Primärkarzinomzellen und HaCaT-Keratinocyten. Zellen, in denen ANX5 mittels spezifischer siRNA herunterreguliert wurde, zeigen ein geringeres Migrations- und auch Invasionspotential verglichen mit Kontrollzellen, die mit einer unspezifischen siRNA behandelt wurden.

In den nachfolgend erläuterten Experimenten wurde das Protein Annexin A5 hinsichtlich seines Migrations- und Invasionspotentials genauer charakterisiert. Dabei sollte untersucht werden, wie sich das Herunterregulieren von Annexin A5 auf Metastasierungs-involvierte Gene auswirkt.

Für die Durchführung der Experimente wurden HaCaT-Keratinocyten, A431-Plattenepithelkarzinom-Zellen und die Primärkultur eines Oralkarzinoms PE15 verwendet.

4.3.1 Annexin A5 beeinflusst das Migrationspotential eines Oralkarzinoms

4.3.1.1 Knock down von Annexin A5 mittels RNA-Interferenz

Um den Einfluss von Annexin A5 auf die Proliferations- und Invasionsfähigkeit zu untersuchen, wurde das Protein in allen verwendeten Zelllinien mittels RNA-Interferenz herunterreguliert. Die Zellen wurden mit spezifischer ANX5-siRNA behandelt und die Transfektionseffizienz auf mRNA-Ebene mittels RT-PCR ermittelt (Abb. 45).

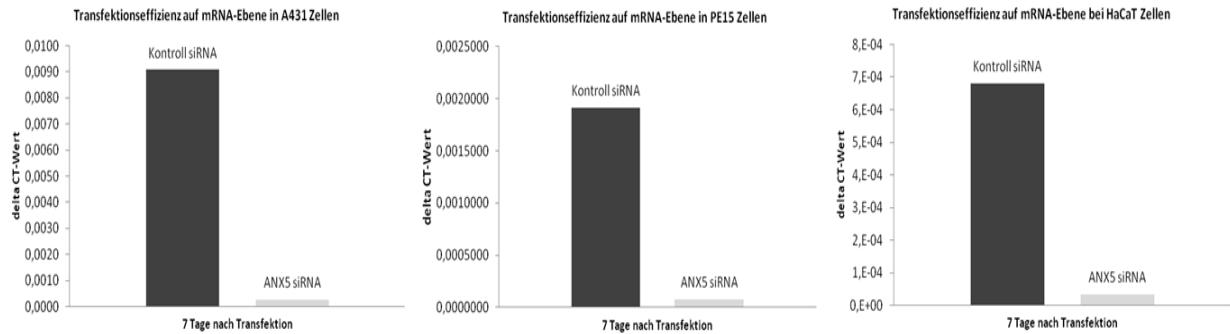


Abbildung 45: Transfektionseffizienz auf mRNA-Ebene

A431, PE15 und HaCaT Zellen wurden sowohl mit einer spezifischen ANX5 siRNA als auch mit einer unspezifischen Kontroll siRNA behandelt. Die Effizienz des *knock down* wurde auf mRNA-Ebene mittels RT-PCR bestimmt. Für eine relative Quantifizierung der Genexpression von Annexin A5 wurde diese auf das nicht regulierte housekeeping-Gen *Aktin* bezogen. Die Normalisierung erfolgte anhand der deltaCT-Methode. 7 Tage nach der siRNA Transfektion ist in allen Zellen eine deutliche Reduktion des *Annexin A5*-Levels zu beobachten.

Die Zellen wurden mit spezifischer ANX5 siRNA behandelt. Nach 72 h wurden die Zellen erneut mit siRNA transfiziert und nach weiteren 4 Tagen geerntet. Wie in Abb. 45 zu erkennen ist, ist 7 Tage nach Behandlung eine signifikante Reduktion des Proteins zu beobachten. Zellen, die mit einer unspezifischen Kontroll siRNA (*non silencing control*, nsc) transfiziert wurden, zeigen eine deutliche Expression von *Annexin A5*. Für alle weiteren siRNA-basierenden Versuche, wurden die Zellen 7 Tage nach der ersten Transfektion geerntet und entsprechend analysiert.

4.3.1.2 Analyse des Migrationsverhaltens mittels Scratch-Assay

Um das Migrationspotential von Annexin A5 genauer zu untersuchen wurde ein Wundheilungsassay, auch Scratch-Assay genannt, durchgeführt. Dabei wurde in einen konfluenten Zellrasen von ANX5 siRNA transfizierten und nsc siRNA transfizierten HaCaT, A431 und PE15 Zellen eine Wunde gekratzt und das Zuwachsen dieser über 96 Stunden beobachtet.

HaCaT und auch PE15 Zellen, die mit spezifischer ANX5 siRNA behandelt wurden, konnten die Wunde innerhalb 48 Stunden nicht schließen. Im Vergleich dazu konnten Zellen, die mit einer unspezifischen siRNA transfiziert wurden, diese Wunde in 48 Stunden nahezu komplett schließen. A431 Zellen konnten die Wunde im Zellrasen schon nach 24 Stunden schließen. Allerdings war das Migrationspotential der Zellen, die mit der spezifischen Annexin A5 siRNA behandelt wurden ähnlich groß. Bereits nach 48 Stunden war der Scratch nahezu komplett geschlossen (Abb. 46).

Die Ergebnisse des Scratch-Assays bestätigten die des Boyden-Kammer-Assays. Auch hier zeigten Zellen, in denen Annexin A5 mit siRNA herunterreguliert wurde, ein vermindertes Migrationspotential verglichen mit Kontrollzellen, die mit einer unspezifischen siRNA behandelt wurden.

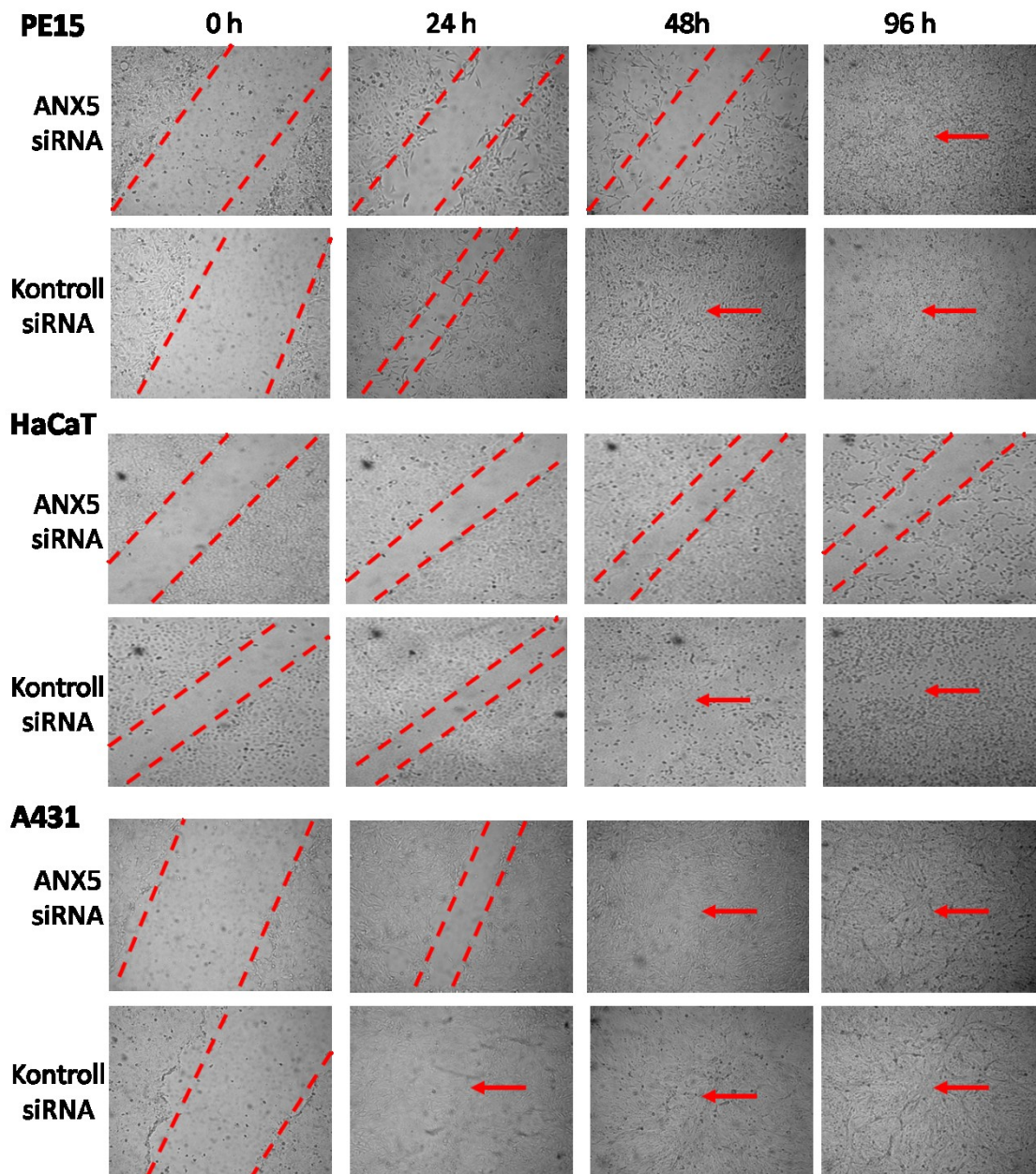


Abbildung 46: Migrationstest mittels Scratch-Assay

Wundheilungsassay von ANX5 depletierten PE15, HaCaT und A431 Zellen. Zellen, in denen Annexin A5 herunterreguliert wurde, konnten die Wunde im Zellrasen schneller schließen als die Kontrollzellen. Die roten Markerlinien zeigen den gesetzten Scratch, Pfeile symbolisieren die geschlossene Wunde.

4.3.1.3 Der *Knock down* von Annexin A5 beeinflusst Metastase-involvierte Gene in HaCaT-Keratinocyten

Im Folgenden sollte untersucht werden, wie sich herunterreguliertes Annexin A5 auf andere Gene auswirkt, die an der Tumorprogression beteiligt sind. Es wurden die Expressionsprofile von 128 Genen, die einen Einfluss auf die Tumor-Metastasierung haben, mit Hilfe eines Oligo GEArray Human Metastasis Microarrays (SA Bioscience) untersucht. Die Gene auf diesem Array kodieren für verschiedene Zell-Adhäsions-Proteine, für Proteine der extrazellulären Matrix, für Proteine des Zellzyklus sowie für einige Transkriptionsfaktoren. Desweiteren umfasst der Array Gene, dessen Proteine am Zellwachstum und der Zellproliferation beteiligt sind.

Hierfür wurden HaCaT-Keratinocyten mit spezifischer siRNA gegen Annexin A5 bzw. unspezifischer siRNA transfiziert. Nach 72 Stunden wurden die Zellen erneut transfiziert und 7 Tage nach der ersten Transfektion geerntet. Anschließend wurde die Gesamt-RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und mit den Array-Membranen hybridisiert. Von insgesamt 128 Genen konnten 27 mit einem Signal auf dem Array detektiert werden. Die Auswertung mit der Software LabImage ergab, dass 18 Gene eine signifikante Änderung der Expression nach Behandlung mit spezifischer Annexin A5 siRNA im Vergleich zur unspezifischen Kontrolle zeigten. Als herunterreguliert wurde ein Gen eingestuft, wenn der Quotient aus dem Expressionsniveau nach ANX5 siRNA Transfektion und dem Expressionsniveau der Kontrollzellen kleiner 0,5 war. Dies konnte bei insgesamt 14 Genen gezeigt werden. Als hochreguliert wurde ein Gen eingestuft wenn dieser Quotient zweifach stärker war. Dies konnte bei insgesamt 4 Genen gezeigt werden. Das Expressionsniveau der übrigen 9 Gene wurde als unverändert eingestuft. Die Ergebnisse sind in Tab. 4 und in Abb. 47 grafisch dargestellt.

Tabelle 4: Expressionsprofil der Metastase-involvierten Gene nach Annexin A5 Depletion

Aufgelistet sind die potentiell durch Annexin A5 regulierten Gene in HaCaT-Keratinocyten, die unter Verwendung des Oligo GEArray Human Metastasis Microarrays ermittelt wurden. Als hochreguliert (+) wurde ein Gen eingestuft, dessen Ratio größer als 2 ist. Als herunterreguliert (-) wurde ein Gen eingestuft, dessen Ratio kleiner 0,5 ist. Gene, deren Expression unbeeinflusst waren sind durch = gekennzeichnet.

Gen-Symbol	Beschreibung	Ratio	+/-/=
NME1	Non-metastatic cells 1, protein (NM23A)	0,81	=
NME2	Non-metastatic cells 2, protein (NM23B)	0,49	=
NME4	Non-metastatic cells 4, protein	0,49	=
CDK4	Cyclin-dependent kinase 4	0,51	=
LAMR1	Ribosomal protein SA	0,47	=
MMP2	Matrix metalloproteinase 2 (gelatinase A)	0,78	=
FXYD5	FXYD domain containing ion transport regulator 5	0,19	-
RHOC	Rhas homolog gene family, member C	0,33	-
S100A4	S100 calcium binding protein A4	0,11	-
SERPINB5	Serine proteinase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 5	0,32	-
SLPI	Secretory leukocyte protease inhibitor (antileukoproteinase)	0,31	-
GPMB	Glycoprotein (transmembrane) nmb	0,24	-
PLAUR	Plasminogen activator, urokinase receptor	0,08	-
PNN	Pinin, desmosome associated protein	0,05	-
TIMP3	Tissue inhibitor of metalloproteinase 3	0,07	-
TMPS4	Transmembrane protease, serine 4	0,40	-
VIL2	Villin 2 (ezrin)	0,05	-
MYC	V-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog	0,04	-
HDAC1	Histone deacetylase 1	0,21	-
NF2	Neurofibromin	1,73	=

KISS1	KISS-1 metastasis suppressor	2,35	+
KAI1	Kangai 1	1,21	=
RB1	Retinoblastoma 1	3,65	+
IL1B	Interleukin 1, beta	1,15	=
MMP10	Matrix metalloproteinase 10	2,05	+
EWSR1	Ewing sarcoma breakpoint region 1	8,01	+
HTATIP2	HIV-1 Tat interactive protein 2	1,23	=

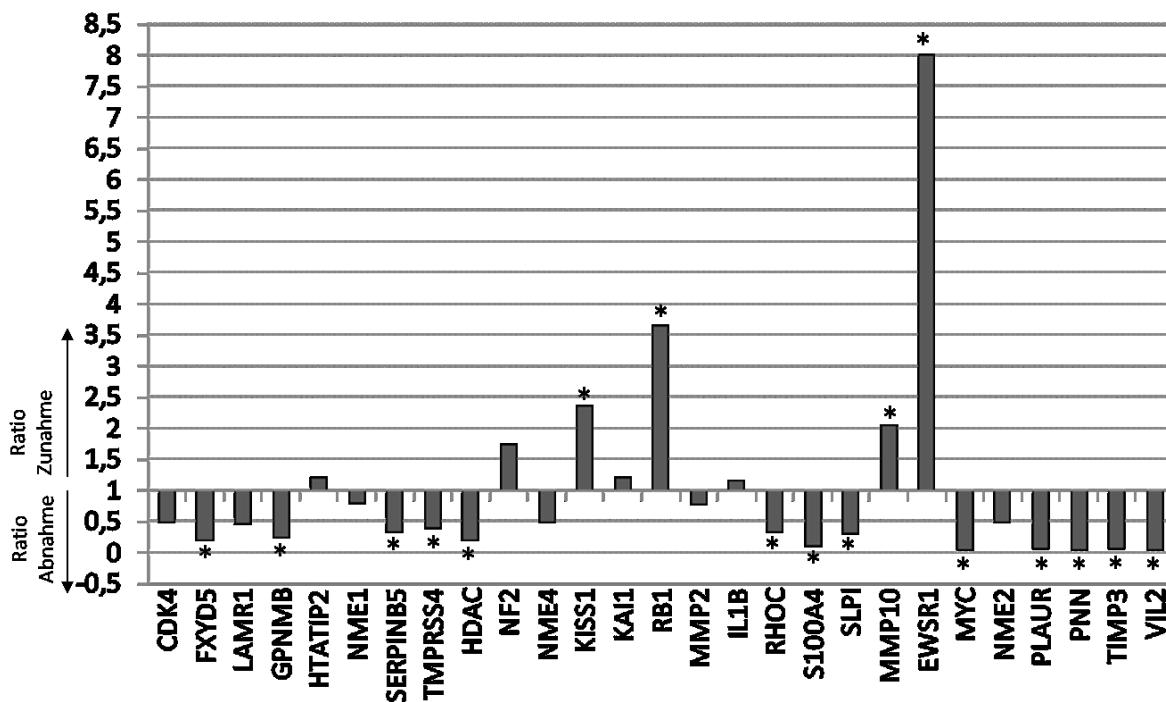


Abbildung 47: Effekt der Annexin A5-Depletion auf Metastase-involvierte Gene

Grafische Darstellung der ermittelten Ratio der 27 auf dem Oligo GEArray Human Metastasis Microarray detektierten Gene. Die Auswertung erfolgte mit der Software LabImage. Die Ratio definiert den Wert, der sich aus dem Expressionsniveau ANX5/Kontrolle ergibt. * markiert die Gene, deren Expression im Vergleich zur Kontrolle über 70 % verändert ist.

4.3.1.4 Die Annexin A5-Depletion beeinflusst die Expression von Metastase-involvierten Genen auch in anderen Zelllinien

Um den Einfluss der Annexin A5-Depletion auf Metastase-involvierte Gene in anderen Zelllinien zu untersuchen, wurde exemplarisch die Expression von *RHOC*, *TIMP3* und *RB1* in der Primärkultur PE15 und der humanen Plattenepithelkarzinom-Zelllinie A431 auf mRNA-Ebene mittels qRT-PCR untersucht. *RHOC* und *TIMP3* zeigten nach *knock down* von Annexin A5 in HaCaT-Keratinocyten eine signifikant verringerte Expression im Vergleich zu den Kontrollzellen. *RB1* zeigte eine deutliche Überexpression nach Annexin A5-Depletion.

Für diese Untersuchung wurden sowohl PE15 als auch A431 Zellen mit ANX5 siRNA transfiziert. Nach 72 Stunden erfolgte eine erneute Transfektion. Als Kontrolle diente eine unspezifische siRNA. 7 Tage nach der ersten Transfektion wurden die Zellen geerntet, die Gesamt-RNA wurde isoliert und in

cDNA umgeschrieben. Diese wurde für die qRT-PCR-Analyse verwendet. Auch auf mRNA-Ebene ist eine deutliche verringerte Genexpression von *RHOC* und *TIMP3* nach Annexin A5-Depletion sowohl in PE15 als auch A431 Zellen zu beobachten. Das Expressionsniveau von *RB1* ist nach ANX5 siRNA-Behandlung in A431 Zellen ebenso wie in den Micorarray-Analysen deutlich angestiegen. In PE15 Zellen ist kein signifikanter Unterschied in der Genexpression von *RB1* nach ANX5 siRNA-Transfektion zu erkennen (Abb. 48).

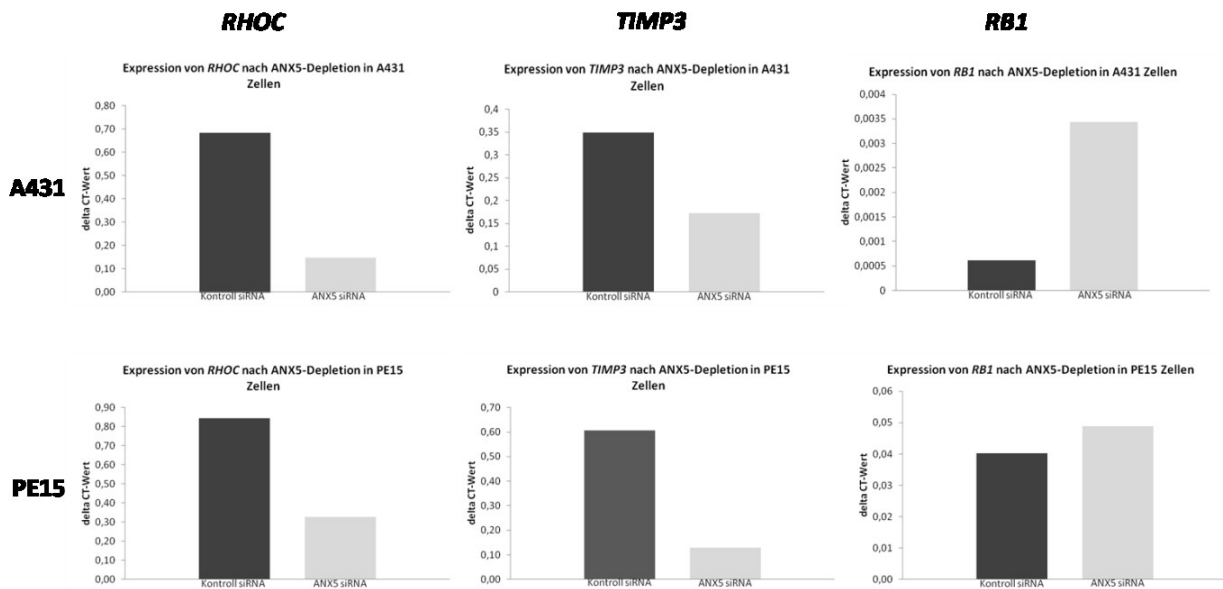


Abbildung 48: mRNA-Expressionsniveau von *RHOC*, *TIMP3* und *RB1* nach ANX5-Depletion

Verglichen wird die mRNA-Menge von *RHOC*, *TIMP3* und *RB1* in ANX5-depletierten PE15 und A431 Zellen mit der aus Kontrollzellen. Für eine relative Quantifizierung wurde die Genexpression auf das nicht regulierte *housekeeping* Gen *Aktin* bezogen. Die Normalisierung erfolgte anhand der delta CT-Methode.

Um zu überprüfen, ob die RNAi-induzierte Depletion von Annexin A5 auch auf Proteinebene wirkt und einen Einfluss auf Metastase-involvierte Gene hat, wurde das Proteinlevel von Annexin A5 und S100A4, einem Protein, das in Tumorprogression und Metastasierung involviert ist, nach *knock down* von Annexin A5 untersucht. Auch hier konnte eine verringerte S100A4-Expression auf Proteinebene nach Annexin A5-Depletion gezeigt werden (Abb. 49).

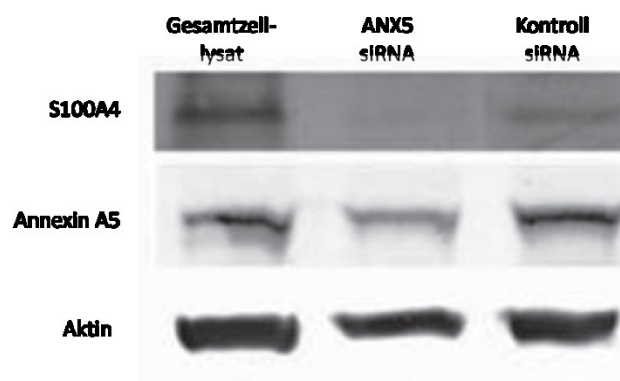


Abbildung 49: Eine Annexin A5-Depletion verändert die Expression Metastase-involvierter Gene auch auf Proteinebene

Die Proteinextrakte von HaCaT-Zellen, die mit spezifischer Annexin A5 siRNA oder unspezifischer Kontroll siRNA transfiziert wurden, wurden im Immunblot hinsichtlich des Expressionsverhaltens von S100A4 und Annexin A5 untersucht. Als Ladekontrolle für gleichmäßig aufgetragene Proteinmengen wurde β -Aktin mitgeführt.

5 Diskussion

In den letzten Jahren wurden eine Vielzahl Protein-basierter Techniken entwickelt, um Biomarker für komplexe Krankheiten zu charakterisieren und zu identifizieren [Chaurand et al. 2004, Melle et al. 2005]. Neben der 2DE-Gelelektrophorese ist die Massenspektrometrie mit all den technischen Variationen eine vielversprechende Technik für die Detektion und Charakterisierung von Proteinen. Sie ermöglicht die Analyse von Proteinen aus Körperflüssigkeiten, Zellen und Geweben [Chaurand et al. 2004, von Eggeling et al. 2007]. Doch mit keiner dieser Methoden ist es möglich die räumliche Verteilung von Proteinen innerhalb des Gewebes in deren funktionellem Kontext zu analysieren. Dies ist jedoch von großer Bedeutung, um die biologische Funktion von Proteinen in ihrem natürlichen Umfeld zu verstehen. Mit *Matrix assisted laser desorption/ionization (MALDI) imaging mass spectrometry (IMS)* kann das molekulare Profil eines Gewebes innerhalb des morphologischen Zusammenhangs direkt auf der Probe erstellt werden [Chaurand et al. 2004, Seeley et al. 2008]. Dabei wird das intakte Gewebe analysiert, ohne vorherige Homogenisierungs- und Separierungsschritte. Für jeden gemessenen Spot innerhalb des Gewebes ist es möglich ein detailliertes Spektrum der exprimierten Proteine zu erhalten. Daraus resultiert ein Bild molekularer Massen mit großer Homologie zur molekularen Histologie. Damit können histoanatomische Strukturen des Gewebes sichtbar gemacht und die funktionelle Heterogenität innerhalb des Gewebes dargestellt werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Technik des MALDI-IMS an humanen Geweben etabliert und angewandt. Dabei konnte das Proteinprofil verschiedener Kopf-Hals-Tumorproben aufgezeigt werden. Schwerpunkt stellte die Verteilung von S100-Proteinen, eine Ca^{2+} -bindende Proteinfamilie, die an einer Vielzahl zellulärer Prozesse beteiligt ist, innerhalb der HNCs dar. Es wurden zudem zwei Kalzium-bindende Proteine, S100A8 und Annexin A5, näher untersucht. Im Fokus der biologischen Charakterisierung standen die Funktion beider Proteine während der Tumorphiliferation und der Metastasierung. Das Ziel dieser Studien ist es, die Biologie der Tumore bzw. der zellulären Proliferation aufzuschlüsseln und dadurch verständlicher zu machen.

5.1 Etablierung der MALDI-IMS-Technik

Um mittels MALDI-IMS ein Proteinprofil von einem Gewebe mit einer guten räumlichen Auflösung und einer guten Auflösung des Massenbereiches zu erstellen, ist vor allem die Matrixapplikation von großer Bedeutung. Diese extrahiert den Analyten vom Gewebe und baut ihn in Matrixkristalle ein. Dadurch wird dieser im MALDI analysierbar. Die Matrixbeschichtung wurde anfangs über manuelles Pipettieren einzelner Matrixtropfen auf den Gewebeschnitt getestet. So wurden 10 Tropfen 20 mg/ml Sinapinsäure (SPA) aufgetragen und trocknen gelassen. Anschließend wurden erneut 10 Tropfen SPA aufgetragen. 40 bis 50 Tropfen Matrix pro Spot sind für ein Spektrum mit einer guten Massenauflösung ausreichend. Die „dried-droplet“-Methode ermöglicht eine gute Analyt-Extraktion, führt aber auch zu einer starken Diffusion dieser Analyten innerhalb des Spots [Schwartz et al. 2003]. Die Matrixspots sind mit 1500 μm bis 2000 μm sehr groß, weswegen sich diese Methode nur für Profiling-Analysen und nicht für das Imaging von Gewebe eignet. Außerdem ist diese Methode der Matrixapplikation nicht exakt reproduzierbar, was einen Vergleich einzelner Messungen untereinander erschwert. Um dies zu ermöglichen, muss die Matrixapplikation automatisch erfolgen. Beim chemischen InkJet printing werden kleine Mengen einer Matrixlösung in einem präzisen, uniformen und reproduzierbaren Muster auf das Gewebe aufgedruckt [Adams RL 1986, Nakanishi et

al. 2005, Delaney et al. 2011]. So können Pikoliter Matrix pro Spot appliziert werden. Der Durchmesser der einzelnen Spots beträgt im Durchschnitt 200 µm und die Matrix befindet sich nur auf den definierten Arealen und nicht auf dem gesamten Gewebeschnitt. Ein großer Vorteil dieser Matrixapplikation ist die Möglichkeit mehrere Matrices auf das Gewebe aufzutragen und somit mehrere Substanzklassen, wie z.B. Proteine und Lipide, auf einer Gewebeprobe zu untersuchen. Auch können andere Lösungen, wie Enzymlösungen für den tryptischen Verdau appliziert werden [Delaney et al. 2011]. Es konnte gezeigt werden, dass mittels Inkjet printing eine bessere räumliche Auflösung erzielt werden kann als mit dem manuellen Auftragen der Matrix. Dieses Verfahren ist jedoch zeitintensiv und das Gewebe wird sehr stark geschädigt, so dass eine sich an die MALDI-IMS-Messung anschließende Hämatoxylin/Eosin-Färbung des Gewebes nicht mehr möglich ist. Somit kann der histomorphologische Abgleich nicht exakt erfolgen. Auch die räumliche Auflösung ist mit diesem Verfahren der Matrixapplikation noch sehr gering, da sowohl die einzelnen Matrixspots (200 µm) als auch der Abstand zwischen den Matrixspots mit einer Zentrum-zu-Zentrum-Distanz von 400 µm zu groß sind.

Um die Auflösung zu verbessern und die Matrixbeschichtung gewebeschonender durchzuführen, wurde der ImagePrep (Bruker Daltonik) getestet. Dieser erzeugt durch vibrative Vernebelung (*vibrational vaporization*) ein Aerosol von Lösungströpfchen, die in einer gesättigten Atmosphäre sensor kontrolliert auf den Gewebeschnitt einwirken. Daraus ergeben sich eine hohe Spektrenqualität bei gleichzeitig hoher Bildauflösung [Schürenberg 2007]. Damit ist es möglich, die zelluläre und molekulare Morphologie innerhalb des Gewebes aufrechtzuerhalten, da das generierte Matrix-Aerosol eine durchschnittliche Tropfengröße von 20 µm aufweist. Somit ist eine theoretische räumliche Auflösung von unter 50 µm [Schürenberg 2006] möglich. Bei dieser Matrixapplikation erlaubt ein optischer Sensor alle wichtigen Präparations-Parameter, wie Auftragsdauer, Auftragsintervall, Dicke der Matrixschicht, Feuchtigkeits- und Trocknungsrate in Echtzeit zu kontrollieren, was eine hohe Reproduzierbarkeit der Präparation gewährleistet und einen Vergleich der einzelnen Messungen untereinander ermöglicht.

Bei der anschließenden MALDI-IMS-Messung werden die Gewebeproben mit Hilfe eines speziellen Lasers mit einer Auflösung von 100 µm bis 200 µm gescannt. Dabei wird ein Massenspektrum für jeden Messpunkt erstellt. Eine Software setzt die erzeugten Spektren in Farbcodes um und entwickelt ein Massenbild des Gewebeschnittes.

Mit solch einem Datensatz ist es möglich die Lokalisation von Proteinen zu bestimmen und Proteine in unmittelbarer Nachbarschaft herauszufinden. Somit ist es machbar funktionale Verbindungen von Proteinen innerhalb einzelner Gewebeareale aufzuzeigen. Dennoch ist die Interpretation solcher Messungen sehr komplex, da hunderte von molekularen Bildern analysiert werden müssen. Weiterhin braucht es eine strenge Kooperation zwischen Proteomikern, Klinikern, Pathomorphologen und Bioinformatikern, die die Ergebnisse im Zusammenhang mit der zugrundeliegenden Histologie und der Klinik evaluieren können [Deininger et al. 2008].

5.2 Darstellung der räumlichen Verteilung von Proteinen innerhalb eines Gewebeschnittes

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden 20 Kopf-Hals-Tumor-Proben, von Oberarzt Dr. Wittekind aus der Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde des Universitätsklinikums Jena zur Verfügung gestellt, mittels MALDI-IMS gemessen und ausgewertet. Dabei konnte jedem gemessenen Spot innerhalb des Gewebes ein detailliertes Spektrum der exprimierten Proteine zugewiesen und jedem

Datensatz dieser Messung ein Bild analog zur Histologie zugeordnet werden. Mit solch einem Bild der molekularen Massen können histoanatomische Strukturen, wie Tumorzellen oder Tumorstroma lokalisiert werden. Dabei konnten Signale detektiert werden, die ausschließlich in bestimmten Gewebeabschnitten, z.B. in epithelialen Tumorzellen oder Gewebsektoren, exprimiert werden. Andere Signale zeigten eine ubiquitäre Verteilung über den gesamten Gewebeschnitt. Somit konnte die Heterogenität eines Tumorgewebes aufgezeigt werden.

Jedoch ist die Sensitivität dieser Technik sehr limitiert. Eine Detektion von Proteinen mit einem Molekulargewicht von 15 kDa und größer [Melle et al. 2009] und von Proteinen mit einem Molekulargewicht unter 500 Da ist nicht möglich [Watrous et al. 2011]. Kleine Proteine gehen im Hintergrundrauschen verloren, sehr große Proteine werden nicht mehr detektiert. Auch Proteine, die nur mit einigen hundert Kopien pro Zelle vorliegen, können nicht detektiert werden [Seeley et al. 2008]. *Surface-enhanced laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry* (SELDI-TOF-MS) ermöglicht eine sehr hohe Sensitivität. Bei diesem Verfahren wird die zu analysierende Probe auf einen ProteinChip Array aufgetragen. Diese Proteinchips besitzen unterschiedliche chromatographische Oberflächen, auf denen Proteine aufgrund ihrer chemischen und physikalischen Eigenschaften binden können. Durch diese spezifische Bindung ist es möglich, Detergenzien und Salze abzuwaschen, so dass diese nicht die MS-Analyse stören. Auch bei diesem Verfahren werden die Proteine in eine energieabsorbierende Matrix eingebettet und nach dem MALDI-TOF-MS-Prinzip analysiert [Hutchens TW 1993, Merchant et al. 2000]. Heute wird SELDI-MS genutzt, um differenziell exprimierte Proteine in Körperflüssigkeiten, Zellen und Gewebe zu untersuchen [Paradis et al. 2005, Escher et al. 2006, Ward et al. 2006, von Eggeling et al. 2007]. Im Allgemeinen wird SELDI für die Analyse von Proteinlysaten mit einer hohen Sensitivität genutzt. Mit einem in unserer Arbeitsgruppe neu entwickelten Verfahren des *toc-MS (tissue on chip-based MS)* wird ein definierter Gewebebereich mittels Laser-basierter Mikrodissektion ausgeschnitten, auf einen ProteinChip Array transferiert und mittels SELDI-MS analysiert [Escher et al. 2010]. Somit kann die Verteilung von Proteinen innerhalb eines Gewebeausschnittes aufgeklärt werden. Dieses Verfahren zeigt eine höhere Sensitivität für einen breiteren Massenbereich als vergleichbare MALDI-Systeme. Proteine mit einem Molekulargewicht von bis zu 30 kDa werden gut detektiert. Bei größeren Analyten geht die Sensitivität verloren, obwohl die technischen Angaben eine Detektion von Proteinen mit einem Molekulargewicht von 330 kDa versprechen. Doch die geringen Analytkonzentrationen in einem mikrodissezierten Gewebeschnitt sind mit diesen Angaben nicht vereinbar [Semmes et al. 2005]. Einige Studien zeigen das Potential der Kombination aus Laser-basierter Mikrodissektion mit der ProteinChip Technologie für die Analyse detaillierter Regionen von Gewebeschnitten und um verschiedene Tumormarker zu identifizieren [Jr et al. 1999, von Eggeling et al. 2000, von Eggeling et al. 2001, Cazares et al. 2002]. Jedoch erlaubt die Kombination aus Laser-basierter Mikrodissektion und ProteinChip Array nicht die detaillierte Analyse der funktionalen Heterogenität des gesamten Gewebes. Die Gewebemikrodissektion kann sich nur an mikroskopisch sichtbaren Grenzen, wie die Abgrenzung von Tumorgewebe zu gesundem Gewebe oder an Zellen mit spezieller Morphologie orientieren. Geweberegionen, die sehr homogen erscheinen, könnten dennoch verschiedene Proteinmuster aufweisen. Dies kann mit der Kombination aus Laser-basierter Mikrodissektion und anschließender SELDI-MS-Analyse nicht aufgelöst werden [Wehder et al. 2010]. Die traditionelle Technik um Proteine innerhalb eines Gewebes zu analysieren ist die Immunhistochemie. Sie ermöglicht die höchste Auflösung bis auf Einzelzellniveau. Es ist möglich zu unterscheiden, ob das Protein im Zellkern, im Zytoplasma oder außerhalb der Zelle lokalisiert ist. Jedoch können nur

bekannte Proteine lokalisiert werden. Außerdem gibt es nicht für jedes Protein verfügbare Antikörper.

Alle drei genannten Techniken um Proteine im Gewebe direkt oder indirekt sichtbar zu machen haben ihre Vor- und Nachteile. In der vorliegenden Arbeit wurden diese gegenübergestellt und verglichen. Dafür wurden serielle Schnitte von Kopf-Hals-Tumorgewebe und HNP1-3 und S100A8 als exemplarische Proteine genutzt. Kopf-Hals-Tumore zeichnen sich durch eine sehr heterogene Gewebestruktur mit vielen verschiedenen Zelltypen und Interaktionen zwischen den effektiven Tumorzellen und den zugehörigen Nicht-Tumor-Bereichen aus. HNP1-3 gehören zur Familie der α -Defensine. Sie werden in neutrophilen Vorläuferzellen synthetisiert und von zirkulierenden reifen Neutrophilen an Entzündungsstellen freigesetzt [Albrethsen et al. 2005, Melle et al. 2005, Albrethsen et al. 2006]. Beim Nierenzellkarzinom [Muller et al. 2002], beim Kolorektalkarzinom oder beim oralen Plattenepithelkarzinom [Lundy et al. 2004] wurde HNP1-3 überexprimiert gefunden. S100A8 wird vorwiegend in neutrophilen Granulozyten und Monozyten exprimiert [Roth et al. 2003, Cheng et al. 2008]. S100A8 erfüllt verschiedenste Funktionen, die meist mit aktiven inflammatorischen Prozessen oder autoimmunen Reaktionen verbunden sind [Roth et al. 2003, Foell et al. 2007]. Desweiteren wird sowohl HNP1-3 als auch S100A8 eine Rolle bei der Regulation der Zellproliferation [Cross et al. 2005, Hermani et al. 2006] und bei der Tumorentstehung sowie Progression [Donato 2001, Heizmann et al. 2002] zugeschrieben. Aufgrund der beschriebenen Funktionen und der relativ geringen und dadurch mit MALDI-IMS gut detektierbaren Molekulargewichte von HNP1-3 und S100A8 (3377 Da, 3448 Da, 3492 Da und 10827 Da), wurden diese Proteine exemplarisch für die Studie ausgewählt und deren räumliche Verteilung mit Mikrodissektion, SELDI-MS, MALDI-IMS und Immunhistochemie analysiert.

Mit MALDI-IMS konnten unter anderen charakteristische Proteinpeaks von 3372 Da, 3444 Da und 3488 Da detektiert werden, die eine sehr hohe Intensität sowohl im Tumorstroma als auch im Bindegewebe und im nekrotischen Gewebe aufweisen. Desweiteren konnte ein Proteinpeak von 10827 Da gemessen werden, der nur im Tumorgewebe, vor allem an der Peripherie des epithelialen Tumors, sowie an der Grenze zum Stroma exprimiert wird. Die Annahme, dass diese Signale den humanen α -Defensinen HNP1-3 (3377 Da, 3448 Da und 3492 Da) beziehungsweise S100A8 (10827 Da) entsprechen, wurde mit Immunhistochemie bestätigt. Es konnte gezeigt werden, dass die humanen Defensine im Stroma des Kopf-Hals-Tumorgewebes, im Bindegewebe und in nekrotischen, inflammatorisch infiltrierten Gewebearealen exprimiert werden. S100A8 wurde vorzugsweise in der Peripherie des epithelialen Tumors und auch in nekrotisch, inflammatorisch infiltrierten Gewebearealen detektiert. Mit allen drei genannten Techniken, konnten die Proteine HNP1-3 und S100A8 in den nahezu identischen Gewebearealen detektiert werden. Mit SELDI-MS kann die Lokalisation allerdings nur den vorher mikrodissoziierten Arealen zugewiesen werden. Eine Lokalisation innerhalb des gesamten Gewebeschnittes ist nicht möglich. Die höchste räumliche Auflösung erhält man mit Immunhistochemie. Diese wird nur durch die Auflösung des Mikroskops limitiert. Weder mit MALDI-IMS noch mit SELDI-MS werden Auflösungen auf Einzelzellniveau erreicht. Die Technik des MALDI-IMS wird allerdings immer weiter entwickelt, so dass diese Limitierung in Zukunft gelöst werden könnte. Die Sensitivität ist für die Aufklärung des Proteinprofils z.B. für Tumorgewebe von großer Bedeutung. Es ist wichtig, dass auch Proteine detektiert werden, die nur in geringer Kopienzahl in der Zelle vorliegen, da es oft nicht die weitverbreiteten „Houskeeping“-Gene sind, die für die Tumorprogression verantwortlich sind. Die MS-basierten Techniken zeigen eine sehr hohe Sensitivität im niedermolekularen Bereich. Doch die Sensitivität geht im höheren molekularen Bereich und für Proteine mit einer geringen Konzentration stark nach

unten. Im Vergleich dazu bietet die Immunhistochemie, vor allem mit fluoreszenzbasierter Detektion, eine hohe Sensitivität im gesamten Massenbereich.

Bei der Erstellung proteomischer Bilder ist es wichtig nicht nur die Proteinpeaks zu detektieren, sondern diese auch zu identifizieren. Mit SELDI-MS konnte in unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass beides für unbekannte Proteine möglich ist. Mittels tryptischen Verdaus wurden sogenannte *peptide mass fingerprints* (PMFs) erstellt, die in Datenbanken eingespeist wurden und somit die eindeutige Bestimmung der dahinterstehenden Proteine ermöglichten. Ein Abgleich über Immunpräzipitation, Immunhistochemie und Re-Mikrodissektion der positiven Areale bestätigten die Identifizierung [Melle et al. 2004]. Auch in der vorliegenden Arbeit konnte über eine Kombination aus Mikrodissektion, Immundepletion bzw. Immuncapturing und SELDI-MS S100A8 spezifisch nachgewiesen werden. Dafür wurde das Protein aus einem seriellen Kryoschnitt der Tumorprobe, in der S100A8 detektiert wurde, depletiert bzw. präzipitiert. Mittels Mikrodissektion wurde der definierte Tumorbereich ausgeschnitten und lysiert. Ein spezifischer S100A8-Antikörper wurde an Protein-A-Agarose Beads gekoppelt. Nach der Inkubation des Lysats mit den Antikörper-gekoppelten Beads wurde für die Immundepletion der Überstand, für das Immuncapturing hingegen das Eluat mittels SELDI-MS untersucht. Nach der Immundepletion konnte ein Signal bei 10,8 kDa in der spezifischen S100A8-Probe im Vergleich zur Prä-Immun-Kontrolle signifikant reduziert werden. Beim Immuncapturing konnte mit demselben S100A8-Antikörper ein Peak bei 10,8 kDa präzipitiert werden, der im Vergleich zur Kontrolle eine höhere Intensität aufweist. Damit konnte die Identifizierung von S100A8 im Tumorbereich der Kopf-Hals-Tumorprobe bestätigt werden. Mit Hilfe von MALDI-IMS ist eine Identifizierung über Tandem-MS theoretisch möglich. Dennoch ist es schwierig, weil die Quantität der Proteine in einem dünnen Gewebeschnitt sehr gering ist und nur Proteine mit einem Molekulargewicht kleiner als 4 kDa fragmentiert werden können. Proteine mit einem höheren Molekulargewicht müssen vorher tryptisch verdaut werden [Cazares et al. 2009, Franck et al. 2009]. Im Rahmen dieser Arbeit wurden sowohl die Identifizierung über Tandem-MS als auch über tryptischen Verdau direkt auf dem Gewebeschnitt getestet. Beim Tandem-MS wurde versucht kleine Proteine zu fragmentieren (1296 Da, 1347 Da und 1621 Da). Doch die Proteine lagen in so geringer Konzentration im Gewebe vor, dass eine Fragmentierung nicht möglich war (Daten nicht gezeigt). Auch der tryptische Verdau war nicht erfolgreich. Trypsin wurde mittels des ImagePrep auf den gesamten Gewebeschnitt aufgesprüht. Dabei wurden alle Proteine verdaut. Eine Unterscheidung der einzelnen Proteinfragmente war unmöglich (Daten nicht gezeigt). Ein Ansatz über Mikrodissektion und SELDI-MS könnte erfolgsversprechend sein, um definierte Areale im Gewebe auszuschneiden und zu verdauen.

Neben der Detektion und Identifikation ist die Quantifikation der Proteine ein entscheidender Punkt in der Analyse des Proteinprofils von Geweben. Alle drei genannten Techniken scheinen semiquantitativ zu sein. Die Intensität der Expression kann über den gesamten Gewebeschnitt aufgezeigt werden. Bei der Immunhistochemie wird die Intensität der Färbung über eine Skala von 0 bis 3 angegeben. Bei der SELDI-MS-Analyse ist eine gute Quantifizierung möglich. Über chromatographische Oberflächen binden nur bestimmte Proteine. Bei MALDI-IMS wird das Gewebe auf eine Stahlplatte ohne chromatographische Oberflächen aufgebracht. Somit ist eine Quantifizierung eines spezifischen Proteins weniger exakt als bei SELDI-MS.

So haben alle drei genannten Techniken zur Aufklärung der räumlichen Verteilung von Proteinen innerhalb eines Gewebes ihre Vor- und Nachteile. Mit MALDI-IMS konnte die Anordnung von verschiedenen Proteinen innerhalb eines Kopf-Hals-Tumorgewebes aufgezeigt werden. Mit einer

Kombination aus Laser-basierter Mikrodissektion und SELDI-MS konnten diese Ergebnisse bestätigt werden. Mittels Immunhistochemie wurde die Lokalisation dieser Proteine innerhalb des Gewebes genauer untersucht. In Zukunft wird MALDI-IMS bezüglich der Sensitivität, der räumlichen Auflösung und auch der Quantifizierung stark verbessert werden und in Kombination mit weiteren bildgebenden Verfahren, wie Positronen-Emissions-Tomographie oder Raman-Spektroskopie eine sehr genaue Darstellung des Proteinprofils von Gewebeschnitten aufzeigen können.

5.3 Verteilung der S100-Proteine innerhalb der Kopf-Hals-Tumore

Das kalziumbindende Protein S100A8 konnte mittels MALDI-IMS, einer Kombination aus Mikrodissektion und SELDI-MS und mit Immunhistochemie im epithelialen Tumorgewebe von Kopf-Hals-Tumoren, vor allem an der Peripherie des epithelialen Tumors, sowie an der Grenze zum Stroma und stellenweise innerhalb des Stromas detektiert und identifiziert werden. Mit Immundepletion bzw. Immuncapturing konnte diese Identifizierung bestätigt werden. Das Gen, das für S100A8 kodiert, ist auf der chromosomalen Region 1q21 lokalisiert. Diese Region unterliegt bei Tumoren häufig Deletionen, Translokationen und Duplikationen. Aus diesem Grund wird dem Protein eine Rolle bei der Tumorentstehung und Progression zugeschrieben [Donato 2001, Heizmann et al. 2002]. Verschiedene Proteinexpressionsstudien haben gezeigt, dass S100A8 in verschiedenen malignen Tumoren differentiell exprimiert vorliegt. So konnte eine erhöhte Expression des Proteins im pankreatischen Adenokarzinom [Shen et al. 2004], im Blasen- [Yao et al. 2007], Magen- [Yong et al. 2007] und Brust-Karzinom [Cross et al. 2005, Salama et al. 2008] sowie in prostatistischen intraepithelialen Neoplasien nachgewiesen werden. Eine stark herabgesetzte Proteinexpression von S100A8 wurde im Plattenepithelkarzinom des Kopf-Hals-Bereiches aufgezeigt [Melle et al. 2004]. Die in unserer Arbeitsgruppe angefertigte Arbeit von Melle zeigt eine verringerte Proteinexpression von S100A8 im Tumorgewebe der Kopf-Hals-Tumore. Im Gegensatz dazu wurde in der vorliegenden Arbeit eine Überexpression von S100A8 im epithelialen Tumorgewebe der Kopf-Hals-Tumore, vor allem an der invasiven Front des Tumors, detektiert. Diese Ergebnisse widersprechen sich und können auch hier nur ansatzweise erklärt werden, da sich die angewandten Methoden sehr ähnelten. Melle et al. konnten mit einer Kombination aus Mikrodissektion, SELDI-MS basierter ProteinChip-Technologie und Immunhistochemie eine verringerte Proteinexpression im Tumor nachweisen. Die in dieser Arbeit genutzten Methoden waren die gleichen und wurden zusätzlich durch die MALDI-IMS-Analyse ergänzt. Damit ist es möglich eine stufenlose Proteinexpression über das gesamte Gewebe aufzuzeigen und somit auch den invasiven Bereich genauer zu untersuchen. Bei der laserbasierten Mikrodissektion wird aus einem ungefärbten Gewebeschnitt der Tumor – bzw. der Normalbereich ausgeschnitten und mittels SELDI-MS untersucht. Dabei kann man nur eine positive oder negative Expression nachweisen, ein Übergang im Gewebe bleibt unberücksichtigt. Auch könnten unterschiedliche Gewebetypen oder verschiedene Tumorstadien Gründe für diesen Widerspruch sein. Andere Studien bringen die Expression von S100A8 mit dem Grad der Invasivität in Verbindung [Seth et al. 2003, Arai et al. 2004, Li et al. 2004, Nagaraja et al. 2006, Bode et al. 2008]. Dies bestätigt wiederum die Detektion von S100A8 an der Peripherie des epithelialen Tumors sowie an der Grenze zum Stroma. Das Protein ist an diesen Stellen desöfteren in beiden Strukturelementen nachweisbar, so dass der Eindruck eines Sekretionsprozesses von den Tumorzellen in Richtung des Stromas entsteht (Abb. 13; 17). Weitere Arbeiten zeigen einen Gradienten innerhalb des Tumors mit einer erhöhten Expression im invadierten Stroma [Hermani et al. 2005]. Das lässt darauf schließen, dass die erhöhte Expression von S100A8 und S100A9 ein Stadium der Tumorgenese und –progression darstellt. Klinische und experimentelle Studien zeigen, dass auch die Expression anderer S100-

Proteine mit der Tumorentwicklung verschiedener Tumore korreliert [Marenholz et al. 2004, Salama et al. 2008]. So liegen S100A4, S100A6, S100A7 und A100B stark überexprimiert in Tumorzellen vor [Ilg et al. 1996, Maelandsmo et al. 1997]. Desweiteren können selbst in unterschiedlichen spezifischen Zellen innerhalb eines Organs unterschiedliche Expressionsraten spezifischer S100-Proteine detektiert werden [Emberley et al. 2004, Melle et al. 2004]. Trotz der hohen Sequenzhomologie und gleicher struktureller Eigenschaften, zeigen die Proteine der S100-Familie kein einheitliches Bild hinsichtlich ihrer Rolle in Tumoren, ihrer Verteilung in Geweben und der von ihnen vermittelten Aktivitäten. Meist ist die Funktion der S100-Proteine in der Tumorzelle noch unbekannt und bedarf intensiver Studien. Aus diesem Grund wurde die Verteilung der S100-Proteine innerhalb der Kopf-Hals-Tumore mittels MALDI-IMS genauer untersucht. S100A7, S100A8 und S100A10 zeigen beim Zungenrandkarzinom vorwiegend eine Lokalisation im Tumorbereich des Gewebes. S100A11 ist überwiegend im Tumorbereich lokalisiert, konnte aber auch in Teilen des Normalgewebes detektiert werden. Auch beim Tonsillenkarzinom zeigten S100A2, S100A8, S100A9 und S100A10 eine vorwiegende Lokalisation innerhalb des Tumorgewebes, wohingegen S100A11 ubiquitär im gesamten Gewebe detektiert werden konnte. Im Vallecule-Karzinom wurden die Proteine S100A8, S100A9 und S100A10 vorwiegend im epithelialen Tumoranteil detektiert. Die Daten wurden mittels Immunhistochemie bestätigt. Das zeigt, dass die S100-Proteine überwiegend im Tumorgewebe der Kopf-Hals-Tumore lokalisiert sind. S100A2 wurde ursprünglich als möglicher Tumorsuppressor identifiziert, da das Protein eine verringerte Expression in Tumoren aufwies [Mueller et al. 2005]. Neuere Studien zeigen jedoch eine Überexpression des Proteins in Brusttumoren [McKiernan et al. 2011]. Auch im Ovarialkarzinom [Hough et al. 2001], frühen Stadien des NSCLCs (nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom) [Diederichs et al. 2004], bei Tumoren der Haut [Shrestha et al. 1998] und der Speiseröhre [Kyriazanos et al. 2002] wurde eine erhöhte Expression von S100A2 beobachtet. Diese Beobachtungen und die Detektion von S100A2 im Tonsillenkarzinom lassen eine wichtige Rolle für S100A2 in der Tumorprogression vermuten. S100A10 hat eine entscheidende Funktion als Plasminogen-Rezeptor. Das Protein ist für die Regulation der Plasmin-Produktion in endothelialen Zellen verantwortlich. S100A10 spielt außerdem eine Schlüsselrolle in der Onkogenese durch die Regulation der proteolytischen Funktion von Plasmin bei Tumorzellen und durch die Regulation der Migration von Makrophagen zu den Tumorstellen [Madureira et al. 2012]. Verschiedene Studien haben gezeigt, dass S100A10 eine Funktion bei der Tumorinvasivität und –Metastasierung spielt. Es wurde gezeigt, dass eine Überexpression von S100A10 zu einer Erhöhung der Metastasenbildung in der Lunge führt [Choi et al. 2003]. Umgekehrt bewirkt eine siRNA vermittelte Herunterregulation eine verringerten Tumorbildung [Madureira et al. 2012]. Außerdem wird das kalziumbindende Protein in verschiedenen Tumorzelllinien exprimiert [Choi et al. 2003, Zhang et al. 2004, Hou et al. 2008, Zhang et al. 2010, O'Connell et al. 2011]. Diese Studien und die Detektion des Proteins im Tumorbereich der Kopf-Hals-Tumore lassen eine Funktion von S100A10 bei der Onkogenese vermuten. S100A11 wurde in der vorliegenden Arbeit überwiegend im Tumorgewebe detektiert, konnte aber auch in Teilen des Normalgewebes lokalisiert werden. Proteinexpressionsstudien haben gezeigt, dass S100A11 in verschiedenen malignen Tumoren differentiell exprimiert vorliegt und eine vom Tumortyp abhängige Expression aufweist [Van Ginkel et al. 1998, Kondo et al. 2002, Melle et al. 2006]. In Tumoren der Prostata und des Pankreas sowie in kolorektalen Karzinomen ist die Proteinexpression von S100A11 stark erhöht und scheint mit einem gesteigerten pathologischen Tumorgrad einherzugehen [Kanamori et al. 2004, Rehman et al. 2004, Melle et al. 2006]. Im Gegensatz dazu ist die Proteinexpression des kalziumbindenden Proteins S100A11 im Blasenkarzinom sowie im Plattenepithelkarzinom des Oesophagus stark herabgesetzt und scheint mit einer Tumorsuppression zu korrelieren. Hier geht eine verminderte S100A11-

Expression mit einer verschlechterten Prognose und einer verringerten Überlebensrate einher [Ji et al. 2004, Memon et al. 2005]. Somit kann S100A11 eine vielseitige Rolle bei der Tumorentstehung und Progression zugeschrieben werden.

Die vorwiegende Detektion der S100-Proteine in epithelialen Tumoranteilen bestätigt die Vermutung, dass die hier lokalisierten S100-Proteine die Tumorgenese und –progression von Kopf-Hals-Tumoren regulieren.

5.4 Segmentierung der MALDI-IMS-Datensätze

Die MALDI-IMS-Analyse ermöglicht die morphologische Darstellung des Proteinprofils eines Gewebeschnittes mit nur einer einzigen Messung. Daraus resultiert ein äußerst komplexer Datensatz mit allen detektierten Signalen. Zurzeit erfolgt die Auswertung der MALDI-IMS-Messung meist manuell durch die Analyse des Gesamtspektrums des Datensatzes. Dies ist enorm zeitintensiv, da hunderte molekulare Bilder analysiert werden müssen. Dabei werden nur die großen Peaks betrachtet und das molekulare Bild mit den ausgewählten m/z -Werten verglichen. Ein molekulares Signal, das nur in einem bestimmten kleinen Gewebeabschnitt detektiert werden kann, ist in dem Gesamtspektrum nur als kleiner Peak oder gar nur als Hintergrundrauschen zu verzeichnen und wird somit nicht in die Auswertung einbezogen. Außerdem werden alle m/z -Werte unabhängig voneinander ausgewertet, obwohl eine Kombination verschiedener Signale mehr Informationen liefern könnte. Eine visuelle Beobachtung erlaubt nur die Detektion der meisten sichtbaren Muster innerhalb des Gewebes, Details und kleine Massenunterschiede können nur sehr schwer detektiert werden. Weiterhin bedarf es der Zusammenarbeit von Proteomikern, Pathologen und Bioinformatikern, um die Ergebnisse hinsichtlich der zugrundeliegenden Histologie und Klinik evaluieren zu können. Mit Hilfe einer speziellen Software lassen sich derzeit die Proteinintensitäten in einer Falschfarbendarstellung über den Gewebeschnitt detektieren. Dennoch kann die gesamte Information bisher nur unzureichend sinnvoll dargestellt werden. Diese sehr zeitaufwendige Analyse der Daten ist somit nicht für klinische Studien anwendbar. Aus diesem Grund war es das Ziel die komplexen MALDI-Datensätze zu vereinfachen, so dass die Auswertung in einer angemessenen Zeit erfolgen kann und zugleich auch die wichtigsten molekularen Eigenschaften berücksichtigt werden. Es wurde eine Methode von Theodore Alexandrov entwickelt, um die Datensätze auf ein Bild, eine sogenannte *segmentaion map*, zu komprimieren. Über mathematische Segmentierung werden ähnliche Spektren einem Bild zugeordnet. Diese Segmentierung erfolgt in vier Schritten: 1. Baseline correction, 2. Peak picking, 3. Denoising der peaks, 4. Clusteranalyse. Je nachdem wie viele Cluster erstellt werden, erhält man einen detaillierteren Einblick in die funktionelle Morphologie des Gewebes. Es lassen sich alle Signale innerhalb eines Segments darstellen, auch die, die im Gesamtspektrum aufgrund ihrer geringen Intensität untergehen und so in der allgemeinen Auswertung nicht berücksichtigt werden. Abbildung 25 zeigt Signale, die mit der manuellen Auswertung des MALDI-Datensatzes nicht detektiert wurden. Erst die Segmentierung in epitheliales und nicht-epitheliales Gewebe macht die Detektion vieler Signale mit einer geringen Intensität möglich. Die *segmentaion maps* repräsentieren in Abhängigkeit von der Anzahl der Cluster die morphologische Zusammensetzung der untersuchten Gewebe exakt und heben proteomisch-funktionell ähnliche Regionen klar hervor. Wie die Abbildung 26 zeigt, werden funktionell ähnliche Regionen mit einer Einbeziehung von mehreren Clustern detaillierter aufgeschlüsselt. Bei 2 Clustern wird das Gewebe in epitheliale und nicht-epitheliale Segmente aufgeteilt. Der Tumorbereich wird bei dieser Clusteranalyse zum epithelialen Gewebebereich dazugezählt. Erst mit einer weiteren Clusteranalyse nach Einberechnung von 10 Clustern trennt sich der Tumorbereich von den anderen

epithelialen Bereichen. Je mehr Cluster mit einberechnet werden, desto mehr Tumorspezifische Signale können detektiert werden. Die erstellten *segmentaion maps* zeigen klar den funktional-morphologischen Aufbau des analysierten Gewebes.

Vergleicht man die *segmentaion maps* der MALDI-IMS-Analyse mit den Standardmethoden der Histologie, wie H&E-Färbungen oder Immunhistochemie, spiegelt die Segmentierung das gesamte Proteinprofil des Gewebes wider. Außerdem basiert diese Methode nicht auf der Detektion über Antikörper, sondern ausschließlich auf der Datenanalyse, mit der man Regionen mit ähnlicher molekularer Beschaffenheit findet. Danach wird das funktional-morphologische Bild mit verschiedenen Farben wiedergegeben, um so einen besseren Überblick zu erhalten. Somit präsentieren die *segmentaion maps* eine proteomische, funktionelle, topographische Karte auf Basis der Gewebemorphologie, die derzeit so mit keiner anderen Methode erstellt werden kann. Obwohl die Interpretation der *segmentaion maps* zeitaufwendig ist und auch histomorphologische Kompetenzen erfordert, bieten sie die Möglichkeit die komplexe, funktionelle und proteomische Heterogenität eines Gewebes innerhalb eines Bildes aufzuzeigen. Dieses Bild zeigt die Verteilung der Peptide/Proteine oder auch Lipide im Gewebe, woraus wiederum wesentliche Aspekte der Funktion von bestimmten Gewebearealen unter diversen Bedingungen, wie Tumorproliferation und –Invasion, erschlossen werden können. Aktuell wird die Interpretation der *segmentaion maps* durch die räumliche Auflösung der Signale während der Messung limitiert. Bei der in dieser Arbeit gezeigten Auflösung von 200 µm und einer derzeitigen möglichen Auflösung von 50 µm bis 20 µm ist diese histologische Aufschlüsselung des Gewebes noch nicht mit der mikroskopischen vergleichbar. Bei einer weiteren Verbesserung der räumlichen Auflösung ist es jedoch denkbar, dass die Segmentierung der MALDI-Datensätze eine etablierte histologische Methode neben der H&E-Färbung und der Immunhistochemie werden könnte [Alexandrov et al. 2010].

5.5 MALDI-IMS von humanen Zellen

Mit der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass mit Hilfe der MALDI-IMS-Technik ein Proteinprofil eines Gewebes erstellt und dessen Morphologie wiedergegeben werden kann. Im Folgenden wurde getestet, ob es praktisch möglich ist kultivierte Zelle mit Hilfe von MALDI-IMS zu analysieren. Dafür wurden Zellen auf einen beschichteten ITO-Objektträger ausgesät und in einer mit DMEM gefüllten Kulturschale über Nacht bei 37 °C im Brutschrank kultiviert. Die Matrixapplikation erfolgte auch hier mit Hilfe des ImagePrep. Anschließend wurde das Proteinprofil der Zellen im Massenspektrometer analysiert. Bei einer für Gewebeschnitte üblichen Laserintensität von ca. 70 % wurde der Zellrasen komplett durchgeschossen und es konnten keine Signale detektiert werden. Demzufolge wurde die Laserintensität gesenkt (bis auf 50 %) und auch die Anzahl der Laserschüsse pro Spot wurde von 300 auf 10 reduziert. Mit diesen Einstellungen konnte ein Proteinprofil der Zellen erstellt werden. Die detektierten Signale zeigten eine homogene Verteilung über den gesamten Analysebereich. Erstrebenswert wäre eine Lokalisation der einzelnen Signale innerhalb der Zellen. Hierbei ist wieder die Auflösung der MALDI-IMS-Analyse der limitierende Faktor. Verschiedenen Methoden der Einzelzellanalyse werden derzeit von Gruppen unter Agar, Caprioli, Li, Predel und Sweedler untersucht. Darunter zählen die *in situ* Mikroinjektion der Matrix auf die Zelle von Interesse [Agar et al. 2010], Mikro- und Induktionsbasierte Strömungselemente (IBF) [Tu et al. 2008, Tu et al. 2009], die Laser Capture Mikrodissektion (LCM) von einzelnen Zellen [Palmer-Toy et al. 2000, Todd et al. 2001, Xu et al. 2002], das gezielte Stretchen von Gewebe [Monroe et al. 2006, Zimmerman et al. 2008] und das Laser-Oversampling [Jurchen et al. 2005]. Eine weitere Methode der Analyse von Einzelzellen ist SIMS (*secondary-ion mass spectrometry*). Damit ist eine räumliche Auflösung von bis

zu 500 nm und damit eine subzelluläre Auflösung möglich [Boggio et al. 2011]. SIMS kann somit für die Charakterisierung von Organellen und für die Detektion von kleinen Molekülen und Metaboliten genutzt werden. Jedoch werden keine Peptide, Proteine und Lipide detektiert [Monroe et al. 2005, Lechene et al. 2006]. Aus diesem Grund kann SIMS eher ergänzend zu MALDI-IMS genutzt werden.

Die Analyse von kultivierten Zellen wurde bisher noch nicht beschrieben und konnte in der vorliegenden Arbeit erstmals gezeigt werden. Prinzipiell ist die Erstellung eines Proteinprofils einzelner Zellen möglich, ist aber auf die Verbesserung der räumlichen Auflösung auf Einzelzellniveau von MALDI-IMS angewiesen.

5.6 Funktionelle Charakterisierung von S100A8 hinsichtlich der Beteiligung an Migrations- und Invasionsprozessen

Für die Charakterisierung eines Proteins ist es wichtig zu wissen, in welchen Geweben und Zellen das Protein exprimiert wird und wo es innerhalb der Zelle lokalisiert ist. Dadurch können Rückschlüsse gezogen werden, ob das Protein gewebespezifisch ist und somit als Biomarker genutzt werden kann. Das in dieser Arbeit zu charakterisierende Protein S100A8 wurde mittels einer Kombination aus MALDI-IMS, SELDI-MS und Immunhistochemie an der invasiven Front von Kopf-Hals-Tumoren detektiert. Aufgrund dieser Lokalisation wird angenommen, dass das Protein eine Rolle bei der Tumorprogression und –Metastasierung spielt.

S100A8 gehört zur Familie der Ca^{2+} -bindenden S100-Proteine. Das Protein kann wie viele andere S100-Proteine als Homodimer in der Zelle vorliegen, bildet jedoch bevorzugt ein funktionelles, antiparalleles Heterodimer mit S100A9, auch bekannt als Calprotectin [Donato 2001, Heizmann et al. 2002]. Das Heterodimer spielt bei einer Vielzahl von intrazellulären Prozessen, wie z.B. bei der Tubulin-abhängigen Zytoskelett-Umordnung [Eue et al. 2000, Vogl et al. 2004], eine wichtige Rolle. Aber auch an extrazellulären Prozessen ist der Proteinkomplex beteiligt. So fungiert es als Gefahr-Signal, fördert Immunantworten und Reparaturmechanismen während Entzündungsprozessen und spielt außerdem eine Rolle in Tumoren [Hermani et al. 2006]. Es ist bekannt, dass S100A8 vorwiegend in myeloiden Zellen exprimiert wird. Die Expression des Proteins scheint auf ein bestimmtes Stadium der myeloiden Differenzierung begrenzt zu sein [Kerkhoff et al. 1998, Nacken et al. 2003] und wird wahrscheinlich durch ein regulatorisches Element geleitet [Kerkhoff et al. 2002]. S100A8 wird in zirkulierenden Neutrophilen und Monozyten exprimiert, jedoch nicht in Gewebsmakrophagen und Lymphozyten [Odink et al. 1987, Lagasse et al. 1988, Zwadlo et al. 1988]. Unter entzündlichen Bedingungen wie beispielsweise Psoriasis ist auch eine Expression in der Epidermis nachweisbar [Brandtzaeg et al. 1987, Wilkinson et al. 1988, Madsen et al. 1992].

Zunächst wurden acht unserem Labor zur Verfügung stehende Zelllinien (U2OS, HaCaT, PE15, PE49, A431, HeLa, FaDu und SW480) auf die endogene Expression von S100A8 untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass keine der getesteten Zelllinien S100A8 exprimiert. Aus diesem Grund wurde das Protein mit Hilfe des Plasmids pVITRO-S100A8/A9 überexprimiert. Es konnte auch gezeigt werden, dass ein erhöhtes Kalziumlevel im Medium die Expression von S100A8 sowohl in HaCaT-Keratinocyten als auch in den FaDu-Zellen steigert. Auch der Heterodimerpartner S100A9 zeigt eine erhöhte Expression nach Zugabe von CaCl_2 . Somit konnten 2 Möglichkeiten gezeigt werden, die Proteinexpression von S100A8/A9 anzuregen, bzw. das Heterodimer zu überexprimieren. Für die weiteren Untersuchungen in dieser Arbeit wurden FaDu-Zellen und HaCaT-Keratinocyten verwendet. FaDu-Zellen sind Zellen eines Hypopharynxkarzinoms und somit aus dem Kopf-Hals-Bereich. HaCaT-

Keratinocyten sind humane, epitheliale, immortalisierte Zellen, die als Modellsystem für Epidermiszellen dienen.

5.6.1 Expression von S100A8 innerhalb der Kopf-Hals-Tumore und Lokalisation innerhalb der Zellen

Mittels MALDI-IMS und Immunhistochemie konnte gezeigt werden, dass S100A8 vorwiegend im Tumorbereich der Kopf-Hals-Tumore exprimiert wird. Sowohl beim Zungenrandkarzinom als auch beim Tonsillenkarzinom und dem Vallecule-Karzinom konnte das Protein fast ausschließlich im Tumorgewebe, vor allem an der Peripherie des epithelialen Tumors nachgewiesen werden. Auch in der Literatur wird eine überwiegende Expression von S100A8 in Plattenepithelkarzinomen diskutiert. So konnte im pankreatischen Adenokarzinom [Shen et al. 2004], im Blasen- [Yao et al. 2007], Magen- [Yong et al. 2007] sowie in prostaticen intraepithelialen Neoplasien eine erhöhte S100A8-Proteinexpression gezeigt werden, wohingegen gutartiges Gewebe keine oder nur eine geringe Expression des Proteins aufweist. Mittels Immunfluoreszenz wurde die Lokalisation von S100A8 innerhalb der Zellen untersucht. Das Protein konnte vor allem innerhalb des Zellkerns detektiert werden. Sowohl bei HaCaT- als auch bei FaDu-Zellen konnten deutliche Fozi im Zellkern beobachtet werden. Im Gegensatz dazu wird in der Literatur eine Lokalisation innerhalb des peripheren Zytoplasmas beschrieben [Broome et al. 2003]. Jedoch konnte S100A8 nicht oder nur sehr schwach in der normalen Epidermis nachgewiesen werden [Kelly et al. 1989, Kunz et al. 1992, Schmidt et al. 2001]. Vielmehr konnte eine starke Expression in Psoriasis-Gewebe gezeigt werden. Einige Mitglieder der S100-Protein-Familie sind in der Lage, sich nach einer Aktivierung durch Kalzium zu verlagern und somit das Ca^{2+} -Signal räumlich und zeitlich zu übertragen [Garbuglia et al. 1996, Wu et al. 1997, Rety et al. 1999, Rety et al. 2000]. Außerdem konnte für andere S100-Proteine eine intrazelluläre Verschiebung aus dem Zytoplasma in den Zellkern, ausgelöst durch einen Anstieg der extrazellulären Ca^{2+} /TGF- β -Konzentration gezeigt werden [Sakaguchi et al. 2004]. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die S100A8-Expression durch CaCl_2 stimuliert, das heißt, es wurde nicht die natürliche Lokalisation von S100A8 gezeigt. So ist es möglich, dass CaCl_2 die Expression von S100A8 stimuliert und das Protein auf Grund der hohen intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration in den Zellkern wandert. Somit kann keine Aussage über die exakte zelluläre Lokalisation des Proteins *in vivo* getroffen werden.

5.6.2 Die Rolle von S100A8/S100A9 bei Migrations- und Invasionsprozessen

Aufgrund der Detektion von S100A8 am Tumorrand der Kopf-Hals-Tumore wurde angenommen, dass das Protein bei Tumorrogressions- und -invasionsprozessen eine Rolle spielt. Auch in der Literatur wurden die S100-Proteine A8 und A9 bereits mit der Tumorentwicklung und -progression [Gebhardt et al. 2002, Ott et al. 2003], bei der Regulation der Zellproliferation [Cross et al. 2005, Hermani et al. 2006], sowie mit metastatischen Prozessen [Hiratsuka et al. 2006] in Verbindung gebracht. Im Rahmen dieser Promotion konnte gezeigt werden, dass sowohl humane HaCaT-Keratinocyten als auch FaDu-Karzinomzellen des Kopf-Hals-Bereiches eine erhöhte Migrationsaktivität und ein erhöhtes Invasionspotential besitzen, wenn Zellen mit dem pVITRO-S100A8/A9-Plasmid transfiziert wurden. Desweiteren konnte mit einem Wundheilungsassay, einem sogenannten „Scratch-Assay“ gezeigt werden, dass das Schließen einer in den konfluenten Zellrasen gekratzten Wunde durch S100A8/A9 gefördert wird. So konnten FaDu-Zellen, in denen S100A8/A9 überexprimiert wurde, die Lücke im Zellrasen nach 168 h komplett schließen. HaCaT-Keratinocyten konnten diese Wunde nach 96 h nahezu komplett schließen. Eine Kultivierung der HaCaT-Zellen darüber hinaus war nicht möglich, da eine offensichtliche Abnahme der S100A8/A9-transfizierten HaCaT-Zellen zu verzeichnen

war. Auch in der Literatur wird den Kalzium-bindenden Proteinen S100A8 und S100A9 eine Rolle bei der Wundheilung zugesprochen, da sie eine signifikant hohe Expression in sich differenzierenden Keratinozyten der suprabasalen Schichten zeigen [Dazard et al. 2003]. Außerdem wurde beschrieben, dass S100A8 und S100A9 die Wanderung von Tumorzellen zu premetastatischen Nischen und somit Migrationsprozesse fördern [Hiratsuka et al. 2006, Rafii et al. 2006]. Voraussetzung für eine Wundheilung und damit für eine gesteigerte Migration ist eine erhöhte Zellproliferation. Mit Hilfe des *colony forming* Assays konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression von S100A8/A9 zu einer Steigerung der Zellproliferation führt. Ein signifikanter Anstieg konnte jedoch nur bei der FaDu-HNC-Zelllinie beobachtet werden. HaCaT-Keratinozyten verzeichnen nur eine leichte Erhöhung der Proliferationsrate nach pVITRO-S100A8/A9 Transfektion. FaDu-Zellen stammen aus einer Primärkultur. Diese zeigen üblicherweise ein erhöhtes Proliferationspotential als immortalisierte Zelllinien.

5.6.2.1 S100A8/A9 beeinflusst die Expression von Metastasis-involvierten Genen

Um den möglichen Einfluss von S100A8/A9 auf die Tumorprogression zu analysieren, wurden die Expressionsprofile von Metastasis-involvierten Genen mit Hilfe des 44 K Microarrays von Agilent erstellt. Mit diesem ist es möglich das Expressionslevel von über 41 000 Genen zu untersuchen. Für diese Auswertung wurden jedoch nur Gene betrachtet, die die Zell-Zell-Adhäsion, den Zellzyklus sowie das Zellwachstum und die Zellproliferation beeinflussen. Zusätzlich wurden Gene, die für Matrixmetalloproteinasen und dessen Inhibitoren, Transkriptionsfaktoren und Regulatoren kodieren, untersucht. Dabei konnten Gene mit einer verminderten oder verstärkten Expression detektiert werden, die im Einklang mit dem beobachteten Phänotyp S100A8-transfizierter Zellen stehen. Auch hier wurde die Expressionsanalyse an HaCaT-Keratinozyten und an der Primärzelllinie FaDu durchgeführt. Dabei zeigten beide Zelllinien sehr homologe Ergebnisse, lediglich die Intensitäten der Expression unterschieden sich teilweise im geringen Maße zwischen den Zelllinien.

Beim Übergang eines epithelialen Tumors zum invasiven, metastasierenden Tumor, werden die Zell-Zell-adhäsiven Strukturen aufgelöst, die Polarität wird geändert und der Tumor unterliegt einer intensiven Reorganisation des zytoskeletalen Systems. Das Genexpressionsmuster innerhalb des Tumors verändert sich, der Tumor wird motil, invadiert in Nachbargewebe und penetriert in die Blutbahn, um Metastasen zu bilden [Kalluri et al. 2009, Thiery et al. 2009]. Dieser Prozess wird als epitheliale mesenchymale Transition (EMT) beschrieben [EW 1996]. Tumore epithelialen Ursprungs erlangen mesenchymalen Charakter, um Migrations- und Invasionsprozesse zu erleichtern. Eine Initialisierung der EMT ist der Verlust epithelialer Marker, wie E-Cadherin und α - und β -Catenin. Dadurch werden Tumorzellen befähigt sich aus dem ursprünglichen Zellverband zu lösen. Eines der bedeutendsten Zell-Adhäsionsmoleküle ist E-Cadherin (CDH1). Es wird auf der basolateralen Seite von epithelialen Zellen exprimiert. Der extrazelluläre Teil des Moleküls bildet den Adhäsionskontakt zu E-Cadherinen anderer Zellen, der intrazelluläre Schwanz bildet einen Komplex mit α -, β - und γ -Catenin. Catenine bilden die Verbindung zwischen E-Cadherin und dem Aktin-Zytoskelett [Kemler 1993, Mareel et al. 1997, Yap et al. 1997]. E-Cadherin und α -Integrin konnten in den Expressionsstudien mit S100A8/A9-transfizierten Zellen mit einer verminderten Expression detektiert werden. *In vitro* Studien zeigen, dass eine Deletion des zytoplasmatischen Schwanzes von E-Cadherin oder Modifizierungen von verschiedenen Cateninen zu einem funktionalen Verlust der E-Cadherin-gesteuerten Zell-Zell-Adhäsion und zu einer erhöhten Zellbeweglichkeit führen [Chen et al. 1997]. *In vivo* wurden viele Studien mit verschiedenen Tumorentitäten durchgeführt, die zeigen, dass das Expressionslevel von E-Cadherin oder Catenin umgekehrt proportional zur Loslösung der Tumorzellen

aus dem Zellverband ist. Das heißt, je geringer die Expression von E-Cadherinen oder Cateninen ist, desto mehr Zellen lösen sich aus dem Zellverband des Primärtumors und werden invasiv [Birchmeier et al. 1994, Gabbert et al. 1996, Nakanishi et al. 1997]. Eine Reduktion der E-Cadherin Expression korreliert mit einer aggressiven Metastasierung und mit einer schlechten Prognose [Berx et al. 2001, Wheelock et al. 2003, Onder et al. 2008]. Es wurde auch beschrieben, dass E-Cadherin eine Rolle bei dem Übergang vom Adenom zum Karzinom im Kolon spielt [Perl et al. 1998].

Neben dem Verlust der epithelialen Marker kommt es während der EMT zu einer erhöhten Expression mesenchymaler Marker. Dazu zählen N-Cadherin, Fibronectin, Matrix-Metalloproteinasen, Integrin α v und β 1 und Aktin [Kang et al. 2004, Thiery et al. 2006, Yang et al. 2008]. Die Genexpressionsanalyse zeigte eine gesteigerte Expression von Fibronectin, β -Integrin, sowie den Matrix-Metalloproteinasen MMP2, MMP3, MMP10 und MMP11 bei einer Überexpression von S100A8/A9. Fibronectin ist ein Glykoprotein der extrazellulären Matrix, das bei Gewebereparatur-, Zelladhäsions- und Migrationsprozessen eine Rolle spielt. Zahllose Studien haben eine erhöhte Expression des Proteins an Stellen der Gewebe-Umordnung, der Organogenese und bei vielen Krankheiten, wie auch Tumoren gezeigt [Jakowlew et al. 1997, Han et al. 2003, Al Saleh et al. 2011]. Auch Integrine sind Glykoproteine der extrazellulären Matrix. Sie sind nicht nur Zelladhäsionsmoleküle, die mechanische Verbindungen zwischen Zellen und deren Matrix vermitteln, sie sind auch Teil der Signaltransduktionskaskade und beeinflussen verschiedene zellbiologische Funktionen wie Migration, Differenzierung, Proliferation und Apoptose [Brooks et al. 1994, Keely et al. 1997, Mainiero et al. 1997, Shaw et al. 1997, Giancotti et al. 1999]. Es wurde *in vitro* und *in vivo* bewiesen, dass Integrine eine Rolle in der Tumorprogression und Metastasierung spielen [Giancotti 2007]. Matrix-Metalloproteinasen gehören zu einer Proteinfamilie, die extrazelluläre Matrix-Komponenten, wie Proteoglykane, Glykoproteine und Proteinfilamente abbauen und somit eine zentrale Rolle bei der Tumor-induzierten Angiogenese, Zell-Migration und -Proliferation spielen [Iida et al. 2004, Vazquez-Ortiz et al. 2005]. Die Proteinfamilie mit mehr als 28 Mitgliedern zeigt in nahezu jedem Tumor eine erhöhte Expression und ist involviert in die Tumorprogression zum einen durch die Spaltung und Freilassung bioaktiver Moleküle, die die Apoptose inhibieren und die Invasion stimulieren und zum anderen durch die Degradation extrazellulärer Matrixkomponenten, die das Tumor-Zell-Wachstum fördern [Al Saleh et al. 2011]. Es wurde beobachtet, dass viele maligne Tumore eine zunehmende Expression von Proteasen zeigen, so dass die proteolytische Degradation der extrazellulären Matrix eine Schlüsselfunktion der Invasivität darstellt [Stetler-Stevenson et al. 1993, Crawford et al. 1994]. Die meisten MMPs (außer MMP11) werden als latente Pro-Enzyme (pro-MMPs) sekretiert und extrazellulär durch proteolytische Spaltung aktiviert [Chambers et al. 1997]. Es wird angenommen, dass MMP11 eine besondere Rolle während der Tumorentwicklung und –progression einnimmt [Deng et al. 2005]. Durch die proteolytische Spaltung der extrazellulären Matrix Komponenten wird postuliert, dass die MMPs in viele biologische Prozesse, wie das Einnisten und die Morphogenese des Embryos, Zell-Migration, Metastasierung, Tumordinvasion und Wundheilung involviert sind [Manes et al. 1997, Pei 2005]. Zum Beispiel werden MMP2, MMP7 und MMP9 in Verbindung mit der Progression und Prognose des Uteruskarzinoms [Honkavuori et al. 2007], des Kolorektalkarzinoms [Ogawa et al. 2005], des Magenkarzinoms [Zheng et al. 2006, Wu et al. 2007], und des Mammakarzinoms [Mylona et al. 2007] gebracht. Auch überexprimiertes MMP11 wurde in humanen Tumoren, wie dem Oralkarzinom [Soni et al. 2003, Arora et al. 2005], in Desmoid-Tumoren [Denys et al. 2004], im nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom [Kettunen et al. 2004] und im oesophagealen Adenokarzinom [Hourihan et al. 2003] detektiert. Darüber hinaus geht eine MMP11 Expression sowohl mit einer gesteigerten Aggressivität des Tumors als auch mit einer

verschlechterten klinischen Prognose einher [Boulay et al. 2001, Andarawewa et al. 2003]. Im Rahmen dieser Arbeit konnten gleich vier MMPs (MMP2, MMP3, MMP10 und MMP11) mit einer gesteigerten Expression in S100A8/A9-transfizierten Zellen detektiert werden, was wiederum die Annahme bestärkt, dass S100A8/A9 in Tumormetastasierungsprozesse involviert ist.

Auch die Expression von MCAM (*melanoma cell adhesion molecule*) ist in Zellen, in denen S100A8/A9 überexprimiert ist, signifikant erhöht. MCAM ist ein Zell-Oberflächen Adhäsionsmolekül, dass in über 70 % metastatischer, aber nicht in normalen Melanomzellen exprimiert wird. Das Proteinlevel von MCAM korreliert mit einem aggressiven, invasiven Verhalten der Melanomzellen *in vitro* und *in vivo* [Mangahas et al. 2004]. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass Antikörper gegen MCAM das Tumorstadium und die Metastasierung des humanen Melanoms inhibieren [Mills et al. 2002]. Im Mausmodell wurde eine Korrelation zwischen einer MCAM Expression und der Tumorstadium und dem Metastasierungspotential gezeigt [Mills et al. 2002]. In verschiedenen Studien konnte eine sehr hohe Expression von MCAM in verschiedensten Tumorentitäten, wie Melanomen [Xie et al. 1997], Prostatakarzinomen [Zhi et al. 2003], Brusttumoren [Zabouo et al. 2009] und nicht kleinzelligen Lungenkarzinomen [Kristiansen et al. 2003] detektiert werden und diese abnormal hohe Expression ist sehr eng mit der Tumorstadium und Metastasierung verbunden. 2006 zeigten Aldovini et al., dass Patienten mit einem epithelialen Ovarialkarzinom mit einer MCAM-Expression sehr viel häufiger ein Rezidiv aufweisen und eine sehr viel geringere Lebenserwartung haben als Patienten, die MCAM nicht exprimieren [Aldovini et al. 2006]. Eine MCAM-depletierte Ovarialkarzinom-Zelllinie SKOV-3 wies eine erhöhte Apoptose-Rate und eine verringerte Zellausbreitung sowie eine verringerte Invasion auf. Auch dies lässt vermuten, dass eine MCAM-Expression mit einem erhöhten Metastasierungspotential des Tumors einhergeht [Wu et al. 2012].

Neben den MMPs und MCAM konnte auch TGF- β 3 mit einer signifikant erhöhten Genexpression in S100A8/A9 transfizierten Zellen detektiert werden. TGF- β 3 (*transforming growth factor beta*) gehört zu einer Protein-Superfamilie, die während der Entwicklung verschiedene zelluläre Prozesse wie Proliferation, Differenzierung und Apoptose steuern [Letterio et al. 1998]. Sie spielen außerdem eine Rolle während der Tumorstadium, indem sie EMT und damit die Invasion und Metastasierung fördern [Tian et al. 2011]. Die Proteinfamilie besteht aus drei Isoformen (TGF- β 1, TGF- β 2 und TGF- β 3), die die Genexpression durch die Aktivierung der Smad Transkriptionsfaktoren regulieren. Von den drei Isoformen scheint TGF- β 3 die größte Rolle bei Tumoren zu spielen. TGF- β 3 induziert die MMP1, MMP3 und MMP10 mRNA Expression in einer Lungenkarzinomzelllinie und stellt somit ein Aktivator der MMP-Gene dar [Petrella et al. 2012]. Außerdem zeigen TGF- β 3 defiziente Mäuse einen Defekt in der pulmonären Entwicklung [Shi et al. 1999]. Somit scheint TGF- β 3 die Metastasierung von Lungentumoren zu stimulieren. Das Protein scheint auch mit anderen Tumorentitäten zu korrelieren. So zeigen klinische Studien einen Anstieg der TGF- β 3 Expression im Zusammenhang mit der Tumorstadium beim Mammakarzinom. Eine erhöhte TGF- β 3 Expression steht im Zusammenhang mit der Bildung von Metastasen im Lymphknoten und korreliert mit einer geringeren Lebenserwartung [Li et al. 1998, Ghellal et al. 2000, Amatschek et al. 2004]. Auch Zellen, die eine Überexpression von S100A8/A9 aufweisen, zeigen eine signifikant erhöhte Expression von TGF- β 3. Bei den FaDu-Zellen ist die Expression von TGF- β 3 228-fach und bei den HaCaT-Keratinocyten sogar 919-fach im Vergleich zu den Kontrollzellen erhöht. Auch TGF- β 2 zeigt in S100A8/A9-transfizierten Zellen eine signifikant höhere Expression (bei FaDu 12-fach erhöht, bei HaCaT 34-fach erhöht) als in den Kontrollzellen.

Auffallend ist auch, dass die Cadherine 6, 8, 11 und 19 eine bis zu 700-fach höhere Expression in S100A8/A9-transfizierten Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen zeigen. Diese Typ-2 Cadherine der Cadherin-Superfamilie sind integrale Membran-Proteine, die die Kalzium-abhängige Zell-Zell-Adhäsion regulieren. Sie spielen eine Rolle bei der Stabilisierung von Zell-Zell-Kontakten, während der Zelldifferenzierung, der embryonalen Morphogenese und der Erhaltung der Zellpolarität. Dennoch wurden einige Cadherine auch in verschiedenen Tumoren detektiert. So konnte eine Studie von Shimoyama eine erhöhte Expression von CDH6 im Leber- und Nierenzellkarzinom zeigen [Shimoyama et al. 1995]. Desweiteren wurde eine Überexpression von CDH6 im kleinzelligen Lungenkarzinom [Yokoi et al. 2002] detektiert und das Protein wird als prognostischer Marker im Ovarialkarzinom beschrieben [Kobel et al. 2008]. Auch konnte eine Überexpression von CDH11 in der invasiven Brustkrebszelllinie MDA-MB-231 detektiert werden [Nagaraja et al. 2006]. Dies lässt eine mögliche Funktion des Proteins bei Metastasierungs- und Invasionsprozessen vermuten. Jedoch wurde eine Methylierung der CpG-Inseln von CDH11 in Lymphknoten-Metastasen eines Melanoms und eines Kopf-Hals-Tumors nachgewiesen. Diese transkriptionale Stilllegung des Gens konnte im Primärtumor nicht beobachtet werden. *In vivo* und *in vitro* Studien zeigten sogar eine Inhibierung des Tumorwachstums, der –motilität und der –ausbreitung [Carmona et al. 2012]. Bis heute gibt es zahlreiche Studien über die Expression von Cadherinen im Epithel aber auch in Tumoren und Metastasen [Behrens et al. 1989, Frixen et al. 1991, Shimoyama et al. 1991, Rasbridge et al. 1993, Gould Rothberg et al. 2006, Jamieson et al. 2011, Zhao et al. 2012]. Es wird postuliert, dass eine gesteigerte Expression von Cadherinen in Tumoren die Invasivität und Progression des Tumors erhöht [Shimoyama et al. 1995, Gould Rothberg et al. 2006, Zhao et al. 2012]. Für diese Dysfunktion der Cadherine in Tumoren sind scheinbar eine Vielzahl von Mechanismen verantwortlich, wie Mutationen [Kanai et al. 1994, Oda et al. 1994] und Aberrationen der Catenine, die die Verbindung der Cadherine zum Zytoskelett herstellen [Ochiai et al. 1994]. Somit kann die erhöhte Expression der Cadherine 6, 8, 11 und 19 in S100A8/A9-transfizierten Zellen auch ein gesteigertes Invasions- und Migrationspotential mit sich bringen.

Dem Protein CXCR4 wird auch eine bedeutende Rolle während der Tumorgenese zugesprochen. CXCR4 ist in vielen Zellen des blutbildenden Systems verbreitet und wird insbesondere von Stammzellen und Tumorzellen exprimiert. Dieser Rezeptor wird durch seinen Liganden CXCL12 aktiviert. CXCR4 spielt eine Schlüsselrolle bei der Mobilisierung und zielgerichteten Wanderung von Stammzellen, bei Entzündungsprozessen sowie bei der Progression und der Metastasierung von Tumoren [Lee et al. 2012]. Eine Sekretion von CXCL12 durch Stromazellen lockt Tumorzellen durch die Stimulation des Rezeptors CXCR4, welcher in Tumorzellen überexprimiert vorliegt, an. Eine CXCL12/CXCR4 Aktivierung reguliert die Ausbreitung der Metastasen in Organe, die CXCL12 in hohem Maße exprimieren [Wang et al. 2006]. So konnte gezeigt werden, dass CXCL12/CXCR4 in Knochenmarks-Metastasen des Prostata Tumors aktiviert vorliegt [Sun et al. 2003, Sun et al. 2005]. Besonders CXCR4 wird mit einem erhöhten Tumorgrad in Verbindung gebracht [Sun et al. 2003]. Zudem wurde gezeigt, dass eine CXCL12/CXCR4 Aktivierung die Adhäsion der Prostata Tumorzellen an die Endothelzellen des Knochenmarks fördert. Ein *in vivo* Metastasierungs-Modell zeigt, dass neutralisierende CXCR4-Antikörper die Metastasenausbreitung limitieren [Sun et al. 2005]. Auch bei der Metastasierung von Brustkrebs spielt die Aktivierung von CXCL12/CXCR4 eine bedeutende Rolle. Brustkrebs-Zellen metastasieren in regionale Lymphknoten, ins Knochenmark, die Lunge oder die Leber. Der Chemokinrezeptor CXCR4 wird durch seinen Liganden CXCL12 aktiviert und steuert die Metastasierung. Eine *in vivo* Neutralisierung von CXCL12/CXCR4 vermindert deutlich die Metastasierung der Brustkrebs-Zellen in regionale Lymphknoten und in die Lunge [Muller et al.

2001]. Auch eine Depletion von CXCR4 mittels einer spezifischen siRNA verringert die Invasion von Mammakarzinom-Zellen [Liang et al. 2005]. In der vorliegenden Arbeit konnte in S100A8/A9-transfizierten Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen eine signifikant erhöhte Expression sowohl von CXCR4 (bei HaCaT-Zellen 267-fach erhöht, bei FaDu-Zellen 123-fach erhöht) als auch des Liganden CXCL12 (698-fach erhöht bei HaCaT-Keratinocyten, 64-fach erhöht bei den FaDu-HNC-Zellen) detektiert werden, was wiederum die Annahme einer Beteiligung von S100A8/A9 an Metastasierungsprozessen bestärkt.

Jedoch konnten auch einige unerwartete Ergebnisse detektiert werden. Zellen, die mit S100A8/A9 transfiziert wurden, zeigten eine verringerte Expression von RhoC. Dies widerspricht der aktuellen Literatur. RhoC gehört zur Proteinfamilie der Rho GTPasen und liegt vor allem in Tumorzellen überexprimiert vor. Das Expressionslevel des Proteins korreliert mit der Tumورprogression und Metastasierung in vielen Karzinomen [Boone et al. 2009]. Zum Beispiel steht die Expression von RhoC mit Lymphknoten-Metastasen von Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches in Verbindung [Kleer et al. 2006]. Außerdem konnte ein Zusammenhang mit einer RhoC-Expression und Lungenmetastasen vom Plattenepithelkarzinom des Ösophagus gezeigt werden [Faried et al. 2006]. Andere Studien dokumentieren eine Rolle des Proteins in der Invasion und Metastasierung im Pankreaskarzinom [Kusama et al. 2006], bei Prostatatumoren [Yao et al. 2006] und Mammakarzinomzellen [Simpson et al. 2004, Pille et al. 2005] und lassen RhoC als Marker für eine schlechte Prognose beim Leberzellkarzinom [Wang et al. 2004], beim Kolonkarzinom [Bellovin et al. 2006] und beim Mammakarzinom [Kleer et al. 2005] vermuten. Eine verringerte RhoC-Expression als Folge einer S100A8/A9-Transfektion kann auch hier nicht vollständig geklärt werden. Möglicherweise unterliegt das Gen einer Deregulation während der Proteinbiosynthese oder Mutationen führen zu einer Dysfunktion des Proteins. Für eine vollständige Klärung sind weitere Untersuchungen nötig.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression des Heterodimers S100A8/A9 Prozesse auslöst, die die Tumorzellen zur Proliferation und Metastasierung anregen. Zell-Zell-Adhäsionsproteine werden herunterreguliert und Gene, die zum Zellwachstum und zur Zellproliferation beitragen, werden vermehrt exprimiert. Außerdem konnte *in vitro* gezeigt werden, dass Zellen, die mit S100A8/A9 transfiziert wurden, ein erhöhtes Migrations- und Invasionspotential zeigen, als die Kontrollzellen. Somit kann angenommen werden, dass der Komplex aus S100A8 und S100A9 eine entscheidende Rolle bei der Tumورprogression und Metastasierung spielt. Da mit den Microarrays von Agilent das mRNA-Expressionslevel der Gene untersucht wurde, kann nicht ausgeschlossen werden, dass die entsprechenden Gene der Translationsregulation oder Degradation unterliegen. Desweiteren kann es innerhalb der Zelle zum Proteinabbau kommen, so dass das cDNA-Level nicht mit der tatsächlichen Proteinkonzentration übereinstimmt [Gygi et al. 1999]. Proteine bestimmen aber die physiologischen Funktionen der Zelle. Somit muss in Zukunft noch die Expression der korrespondierenden Proteine untersucht werden.

5.7 Annexin A5 beeinflusst das Migrationsverhalten eines Oralkarzinoms

Annexin A5 gehört zur Klasse der Kalzium- und Phospholipid-bindenden Proteine. Diese Familie ist sehr weit verbreitet. Annexine kommen in nahezu allen Reichen der Natur vor [Bandorowicz-Pikula et al. 2001]. Dennoch sind die physiologischen Funktionen weitgehend unbekannt [Kenis et al. 2007]. Annexin A5 wurde als Blutgerinnungs-hemmendes Protein beschrieben [Reutelingsperger et al. 1985]. Bei einer erhöhten intrazellulären Kalzium-Konzentration wird es vom Zytosol zur Membran transferiert und bindet dort an Phosphatidylserin [Barwise et al. 1996]. Weitere Funktionen von

Annexin A5 konnten bislang nur *in vitro* beschrieben werden. Vesikeltransport, eine direkte Beteiligung an Apoptose [Wang et al. 2003] und Kalzium-Kanal-Aktivitäten [Kubista et al. 1999, Isas et al. 2000] konnten *in vivo* nur ansatzweise nachgewiesen werden.

In früheren Studien unserer Arbeitsgruppe wurde Annexin A5 am Tumorrand von Kopf-Hals-Tumoren signifikant hochreguliert gefunden [Melle et al. 2003]. Aus diesem Grund wurde das Protein hinsichtlich einer möglichen Funktion bei der Tumorprogression und –invasion analysiert. Dabei konnte gezeigt werden, dass sowohl humane HaCaT-Keratinocyten als auch Zellen einer Primärkultur eines Oralkarzinoms (PE15) eine verringerte Migrationsaktivität und ein verringertes Invasionspotential zeigen wenn Annexin A5 mittels RNA-Interferenz herunterreguliert wurde [Wehder et al. 2009]. Dieser Effekt ist bei den PE15-Primärkulturzellen stärker ausgeprägt als bei den HaCaT-Keratinocyten. Diese immortalisierte Zelllinie hat möglicherweise ihr ursprüngliches Migrationspotential während der Kultivierung verloren. Hingegen zeigen Zellen aus dem Oralkarzinom typischerweise ein stärkeres Migrationsverhalten als Zellen aus gesundem Gewebe. Somit lassen sich die unterschiedlichen Intensitäten erklären. Die hier erzielten Ergebnisse stehen jedoch im Kontrast zu einer Studie von Balch, die 1997 postulierten, dass Annexin A5 die Migration von metastatischen Zellen bei Lungentumoren hemmt [Balch et al. 1997]. Eine Erklärung für die unterschiedlichen Ergebnisse könnte zum einen sein, dass Annexin A5 spezifische Effekte nur auf bestimmte Tumorarten ausübt. Zum anderen wurden die hier erzielten Ergebnisse an endogen exprimierten Annexin A5 gezeigt. Balch et al transfizierten extrazelluläres Annexin A5. Andererseits bestätigten Nakao et al. unsere Ergebnisse, indem auch sie zeigten, dass Annexin A5 die Zellmigration von normalen humanen Keratinocyten (NHK) fördert [Nakao et al. 1994]. Weiterhin wurde sowohl *in vivo* als auch *in vitro* beobachtet, dass die Wundheilung von Hornhautepithel von Annexin A5 gefördert wird [Watanabe et al. 2006]. Auch in dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das Schließen einer in den Zellrasen gekratzten Wunde durch Annexin A5 begünstigt wird. So waren HaCaT- und PE15-Zellen, in denen Annexin A5 mittels einer spezifischen siRNA herunterreguliert wurde, nicht in der Lage die Wunde in einem konfluenten Zellrasen innerhalb von 48 Stunden zu schließen. Im Gegensatz dazu konnten Kontrollzellen, die endogenes Annexin A5 exprimieren diesen sogenannten Scratch überwachsen. Zusätzlich wurde eine offensichtliche Abnahme von Annexin A5 siRNA-behandelten HaCaT-Zellen beobachtet.

Somit wurde mittels Boyden-Kammer und Scratch-Assay eine Beteiligung von Annexin A5 an Migrations- und Invasionsprozessen gezeigt. Zellmigration wird definiert als die aktive Fortbewegung von Zellen und ist ein zentraler Prozess in der Entwicklung und Aufrechterhaltung von multizellulären Organismen [Pollard et al. 2000]. Migrationsprozesse spielen bei der Gewebeformation während der Embryonalentwicklung, bei der Wanderung von Keratinocyten während der Wundheilung oder der von Immunzellen während der Immunantwort, aber auch bei der Wanderung von Zellen während der Metastasierung eine Rolle. Invasionsprozesse regulieren ebenfalls entscheidend die Metastasierung von Tumorzellen.

5.7.1 Annexin A5 beeinflusst die Expression von Metastase-involvierten Genen

Um die mögliche Rolle von Annexin A5 bei Metastasierungsprozessen aufzuklären, wurde die Wirkung der Depletion von Annexin A5 auf andere metastasierungsrelevante Gene mittels DNA-Microarrays untersucht. Hierbei konnten Gene mit einer verminderten oder verstärkten mRNA-Expression detektiert werden, die im Einklang mit dem beobachteten Phänotyp Annexin A5-depletierter Zellen stehen. In HaCaT-Zellen, die eine verminderte Migrations- und Invasionsaktivität

aufgrund der siRNA-induzierten Annexin A5-Depletion aufweisen, zeigen einige Gene eine Annexin A5-regulierte Expression. Diese veränderte Genexpression korreliert mit der biologischen Funktion der Genprodukte hinsichtlich Proliferations- und Invasionsprozessen.

Beispielsweise wurden *Kiss-1* und *RB1* mit einer deutlich erhöhten Expression in Annexin A5-Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen detektiert. *CDK4*, *RhoC* und *S100A4* zeigten eine verminderte Expression in diesen Zellen. Sowohl pRB als auch CDK4 sind involviert in die Regulation des Zellzyklus [Miller et al. 2007]. KISS-1 wird als Suppressor der Metastasierung beschrieben und S100A4 und RhoC sind in die Tumorprogression und Metastasierung involviert [Navenot et al. 2005, Garrett et al. 2006, Saleem et al. 2006, Boone et al. 2009]. Da Proteine die physiologischen Funktionen der Zellen bestimmen wurde die Expression der korrespondierenden Proteine untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass eine Annexin A5-Depletion die Proteinexpression von S100A4 auf die gleiche Weise beeinflusst wie auch die mRNA-Expression. Einige Gene, die mit dem Microarray analysiert wurden, zeigten auch ein unerwartetes Ergebnis in Zellen, die eine reduzierte Migrations- und Invasionsaktivität zeigen. Beispielsweise wurde MMP10 (*Matrix-Metalloproteinase 10*) mit einer erhöhten und TIMP3 (*tissue inhibitor of metalloproteinase 3*) mit einer verminderten Expression detektiert. Dies widerspricht der aktuellen Literatur [Gill et al. 2004, Riddick et al. 2005] und kann auch hier nicht vollständig erklärt werden. MMP2 konnte wie erwartet mit einer verminderten Expression in HaCaT-Keratinocyten mit reduzierter Annexin A5 Expression detektiert werden. Möglicherweise zeigen unterschiedliche Matrix-Metalloproteinasen verschiedene, genau ausbalancierte Aktivitäten während der Zellmigration und -invasion auf. Zusätzlich scheint ein reduziertes Invasionspotential eine verringerte Expression von allgemeinen Inhibitoren des Invasionsprozesses auszulösen, wie es beispielsweise mit der verminderten Expression von TIMP3 gezeigt werden konnte [Baker et al. 1999]. Für die vollständige Klärung bedarf es weiterer Untersuchungen.

Auf der Basis der hier gezeigten Daten wird spekuliert, dass Annexin A5 die Invasion von humanen Tumorzellen beeinflusst. Es müsste weiterhin geklärt werden, ob dieser Einfluss direkt über die Interaktion mit der Zellmembran oder über Wechselwirkungen mit anderen Proteinen erfolgt.

So konnten im Rahmen dieser Arbeit zwei kalziumbindende Proteine detektiert werden, denen eine mögliche Funktion während der Tumorprogression und Metastasierung zugeschrieben werden kann. Das Heterodimer aus S100A8/A9 gehört zu der Gruppe der Ca^{2+} -modulierten Signalproteine der EF-Hand-Familie. Annexin A5 gehört zur Gruppe der Ca^{2+} - und Phospholipidbindenden Proteine. Boyden-Kammer- und Scratch-Assays bestätigten die Vermutung einer Beteiligung beider Proteine an Migrations- und Invasionsprozessen. Auch konnte eine Stimulation von metastasis-relevanten Proteinen durch S100A8/A9 und Annexin A5 aufgezeigt werden.

5.8 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnte die Technik des MALDI-IMS von humanen Tumoren etabliert und angewandt werden. Durch das gesteigerte Interesse an dieser MS-Technik ist ein stetiger Fortschritt in der technischen Entwicklung zu beobachten. So wurden im Laufe dieser Arbeit die Laserfrequenz, die räumliche Auflösung, die Sensitivität für höhere Massen, die Massenauflösung und die Massengenauigkeit verbessert. Im Herbst 2012 wurde das neue ultrafleXtreme-Massenspektrometer mit einem 2 kHz Smartbeam Laser in Betrieb genommen, welches die genannten Kriterien erfüllt. Eine in unserer Arbeitsgruppe gerade begonnenen Promotionsarbeit von Lavanya Mokada.Gopal wird das Proteinprofil von Kopf-Hals-Tumoren mit einer Kombination aus MALDI-IMS am ultrafleXtreme und Raman-Spektroskopie erstellen. Durch diese Kombination der bildgebenden Verfahren ist eine exakte Lokalisation von Peptiden, Proteinen und Lipiden innerhalb der Gewebeareale möglich und es können detaillierte Aussagen über die Zusammensetzung von Tumoren getroffen werden. Mit diesem neuen Massenspektrometer kann auch der Prozess des MALDI-IMS an humanen Zelllinien wieder aufgegriffen und verbessert werden. Mit einer höheren Auflösung können einzelne Signale innerhalb der Zellen detektiert werden.

Auch das Protein-Heterodimer S100A8/A9 kann innerhalb des Tumors exakt lokalisiert werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde postuliert, dass der Proteinkomplex die Invasion von humanen Tumorzellen und auch die Expression der Gene beeinflusst, die an Migrations- und Invasionsprozessen beteiligt sind. Allerdings wurde hier der Gen- und nicht der Proteinstatus untersucht. Diese bestimmen jedoch die physiologischen Funktionen der Zelle. Somit muss in Zukunft die Expression auf Proteinebene untersucht werden, um zu bestätigen, dass S100A8/A9 auch die Proteinexpression beeinflusst.

Auch für das Kalzium-bindende Protein Annexin A5 wird spekuliert, dass es die Invasionsprozesse in humanen Tumorzellen beeinflusst. Allerdings konnte noch nicht geklärt werden, ob dieser Einfluss direkt oder indirekt über die Regulation über andere Proteine erfolgt. Dieses Wissen ist jedoch für das Verständnis des Einflusses von Annexin A5 auf die Tumordinvasion essentiell.

6 Verzeichnisse

6.1 Literaturverzeichnis

- Adams RL, R. J.** (1986). "A one-dimensional numerical model of a drop-on-demand ink jet." *J Appl Mech* 53(1): 193–197.
- Agar, N. Y., J. M. Kowalski, P. J. Kowalski, J. H. Wong and J. N. Agar** (2010). "Tissue preparation for the in situ MALDI MS imaging of proteins, lipids, and small molecules at cellular resolution." *Methods Mol Biol* 656: 415–431.
- Al Saleh, S., L. H. Sharaf and Y. A. Luqmani** (2011). "Signalling pathways involved in endocrine resistance in breast cancer and associations with epithelial to mesenchymal transition (Review)." *Int J Oncol* 38(5): 1197–1217.
- Albrethsen, J., R. Bogebo, S. Gammeltoft, J. Olsen, B. Winther and H. Raskov** (2005). "Upregulated expression of human neutrophil peptides 1, 2 and 3 (HNP 1–3) in colon cancer serum and tumours: a biomarker study." *BMC Cancer* 5: 8.
- Albrethsen, J., C. H. Moller, J. Olsen, H. Raskov and S. Gammeltoft** (2006). "Human neutrophil peptides 1, 2 and 3 are biochemical markers for metastatic colorectal cancer." *Eur J Cancer* 42(17): 3057–3064.
- Aldovini, D., F. Demichelis, C. Doglioni, D. Di Vizio, E. Galligioni, S. Brugnara, B. Zeni, C. Griso, C. Pegoraro, M. Zannoni, M. Gariboldi, E. Balladore, D. Mezzanzanica, S. Canevari and M. Barbareschi** (2006). "M-CAM expression as marker of poor prognosis in epithelial ovarian cancer." *Int J Cancer* 119(8): 1920–1926.
- Alexandrov, T., M. Becker, S. O. Deininger, G. Ernst, L. Wehder, M. Grasmair, F. von Eggeling, H. Thiele and P. Maass** (2010). "Spatial segmentation of imaging mass spectrometry data with edge-preserving image denoising and clustering." *J Proteome Res* 9(12): 6535–6546.
- Amatschek, S., U. Koenig, H. Auer, P. Steinlein, M. Pacher, A. Gruenfelder, G. Dekan, S. Vogl, E. Kubista, K. H. Heider, C. Stratowa, M. Schreiber and W. Sommergruber** (2004). "Tissue-wide expression profiling using cDNA subtraction and microarrays to identify tumor-specific genes." *Cancer Res* 64(3): 844–856.
- Amstalden van Hove, E. R., D. F. Smith and R. M. Heeren** (2010). "A concise review of mass spectrometry imaging." *J Chromatogr A* 1217(25): 3946–3954.
- Andarawewa, K. L., A. Boulay, R. Masson, C. Mathelin, I. Stoll, C. Tomasetto, M. P. Chenard, M. Gintz, J. P. Bellocq and M. C. Rio** (2003). "Dual stromelysin-3 function during natural mouse mammary tumor virus-ras tumor progression." *Cancer Res* 63(18): 5844–5849.
- Anderson, D. M., V. A. Carolan, S. Crosland, K. R. Sharples and M. R. Clench** (2009). "Examination of the distribution of nicosulfuron in sunflower plants by matrix-assisted laser desorption/ionisation mass spectrometry imaging." *Rapid Commun Mass Spectrom* 23(9): 1321–1327.
- Andree, H. A., C. P. Reutelingsperger, R. Hauptmann, H. C. Hemker, W. T. Hermens and G. M. Willems** (1990). "Binding of vascular anticoagulant alpha (VAC alpha) to planar phospholipid bilayers." *J Biol Chem* 265(9): 4923–4928.
- Arai, K., T. Teratani, R. Kuruto-Niwa, T. Yamada and R. Nozawa** (2004). "S100A9 expression in invasive ductal carcinoma of the breast: S100A9 expression in adenocarcinoma is closely associated with poor tumour differentiation." *Eur J Cancer* 40(8): 1179–1187.
- Arcuri, C., R. Bianchi, F. Brozzi and R. Donato** (2005). "S100B increases proliferation in PC12 neuronal cells and reduces their responsiveness to nerve growth factor via Akt activation." *J Biol Chem* 280(6): 4402–4414.
- Arora, S., J. Kaur, C. Sharma, M. Mathur, S. Bahadur, N. K. Shukla, S. V. Deo and R. Ralhan** (2005). "Stromelysin 3, Ets-1, and vascular endothelial growth factor expression in oral precancerous and cancerous lesions: correlation with microvessel density, progression, and prognosis." *Clin Cancer Res* 11(6): 2272–2284.
- Bailey, M. J., BN.; Hinder, S.; Watts, J.; Bleay, S.; Webb, RP.** (2010). "Depth profiling of fingerprint and ink signals by SIMS and MeV SIMS." *Nucl Instrum Methods B*. 268: 1929.
- Baker, A. H., S. J. George, A. B. Zaltsman, G. Murphy and A. C. Newby** (1999). "Inhibition of invasion and induction of apoptotic cell death of cancer cell lines by overexpression of TIMP-3." *Br J Cancer* 79(9–10): 1347–1355.
- Balch, C. and J. R. Dedman** (1997). "Annexins II and V inhibit cell migration." *Exp Cell Res* 237(2): 259–263.

- Balluff, B., M. Elsner, A. Kowarsch, S. Rauser, S. Meding, C. Schuhmacher, M. Feith, K. Herrmann, C. Rocken, R. M. Schmid, H. Hofler, A. Walch and M. P. Ebert** (2010). "Classification of HER2/neu status in gastric cancer using a breast-cancer derived proteome classifier." *J Proteome Res* 9(12): 6317-6322.
- Balluff, B., C. Schone, H. Hofler and A. Walch** (2011). "MALDI imaging mass spectrometry for direct tissue analysis: technological advancements and recent applications." *Histochem Cell Biol* 136(3): 227-244.
- Bandorowicz-Pikula, J., R. Buchet and S. Pikula** (2001). "Annexins as nucleotide-binding proteins: facts and speculations." *Bioessays* 23(2): 170-178.
- Barwise, J. L. and J. H. Walker** (1996). "Annexins II, IV, V and VI relocate in response to rises in intracellular calcium in human foreskin fibroblasts." *J Cell Sci* 109 (Pt 1): 247-255.
- Baudier, J. and D. Gerard** (1983). "Ions binding to S100 proteins: structural changes induced by calcium and zinc on S100a and S100b proteins." *Biochemistry* 22(14): 3360-3369.
- Beccafico, S., F. Riuzzi, C. Puglielli, R. Mancinelli, S. Fulle, G. Sorci and R. Donato** (2011). "Human muscle satellite cells show age-related differential expression of S100B protein and RAGE." *Age (Dordr)* 33(4): 523-541.
- Behlke, M. A.** (2006). "Progress towards in vivo use of siRNAs." *Mol Ther* 13(4): 644-670.
- Behrens, J., M. M. Mareel, F. M. Van Roy and W. Birchmeier** (1989). "Dissecting tumor cell invasion: epithelial cells acquire invasive properties after the loss of uvomorulin-mediated cell-cell adhesion." *J Cell Biol* 108(6): 2435-2447.
- Bellovin, D. I., K. J. Simpson, T. Danilov, E. Maynard, D. L. Rimm, P. Oettgen and A. M. Mercurio** (2006). "Reciprocal regulation of RhoA and RhoC characterizes the EMT and identifies RhoC as a prognostic marker of colon carcinoma." *Oncogene* 25(52): 6959-6967.
- Berx, G. and F. Van Roy** (2001). "The E-cadherin/catenin complex: an important gatekeeper in breast cancer tumorigenesis and malignant progression." *Breast Cancer Res* 3(5): 289-293.
- Birchmeier, W. and J. Behrens** (1994). "Cadherin expression in carcinomas: role in the formation of cell junctions and the prevention of invasiveness." *Biochim Biophys Acta* 1198(1): 11-26.
- Blackwood, R. A. and J. D. Ernst** (1990). "Characterization of Ca²⁺-dependent phospholipid binding, vesicle aggregation and membrane fusion by annexins." *Biochem J* 266(1): 195-200.
- Bode, G., A. Luken, C. Kerkhoff, J. Roth, S. Ludwig and W. Nacken** (2008). "Interaction between S100A8/A9 and annexin A6 is involved in the calcium-induced cell surface exposition of S100A8/A9." *J Biol Chem* 283(46): 31776-31784.
- Boggio, K. J., E. Obasuyi, K. Sugino, S. B. Nelson, N. Y. Agar and J. N. Agar** (2011). "Recent advances in single-cell MALDI mass spectrometry imaging and potential clinical impact." *Expert Rev Proteomics* 8(5): 591-604.
- Boone, B., M. Van Gele, J. Lambert, M. Haspeslagh and L. Brochez** (2009). "The role of RhoC in growth and metastatic capacity of melanoma." *J Cutan Pathol* 36(6): 629-636.
- Boukamp, P., R. T. Petrussevska, D. Breitkreutz, J. Hornung, A. Markham and N. E. Fusenig** (1988). "Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line." *J Cell Biol* 106(3): 761-771.
- Boulay, A., R. Masson, M. P. Chenard, M. El Fahime, L. Cassard, J. P. Bellocq, C. Sautes-Fridman, P. Basset and M. C. Rio** (2001). "High cancer cell death in syngeneic tumors developed in host mice deficient for the stromelysin-3 matrix metalloproteinase." *Cancer Res* 61(5): 2189-2193.
- Brachvogel, B., J. Dikschas, H. Moch, H. Welzel, K. von der Mark, C. Hofmann and E. Poschl** (2003). "Annexin A5 is not essential for skeletal development." *Mol Cell Biol* 23(8): 2907-2913.
- Brachvogel, B., H. Welzel, H. Moch, K. von der Mark, C. Hofmann and E. Poschl** (2001). "Sequential expression of annexin A5 in the vasculature and skeletal elements during mouse development." *Mech Dev* 109(2): 389-393.
- Brandtzaeg, P., I. Dale and M. K. Fagerhol** (1987). "Distribution of a formalin-resistant myelomonocytic antigen (L1) in human tissues. II. Normal and aberrant occurrence in various epithelia." *Am J Clin Pathol* 87(6): 700-707.
- Brett, W., A. Mandinova, A. Remppis, U. Sauder, F. Ruter, C. W. Heizmann, U. Aebi and H. R. Zerkowski** (2001). "Translocation of S100A1(1) calcium binding protein during heart surgery." *Biochem Biophys Res Commun* 284(3): 698-703.
- Brooks, P. C., A. M. Montgomery, M. Rosenfeld, R. A. Reisfeld, T. Hu, G. Klier and D. A. Cheresh** (1994). "Integrin alpha v beta 3 antagonists promote tumor regression by inducing apoptosis of angiogenic blood vessels." *Cell* 79(7): 1157-1164.

- Broome, A. M., D. Ryan and R. L. Eckert** (2003). "S100 protein subcellular localization during epidermal differentiation and psoriasis." *J Histochem Cytochem* 51(5): 675-685.
- Brozzi, F., C. Arcuri, I. Giambanco and R. Donato** (2009). "S100B Protein Regulates Astrocyte Shape and Migration via Interaction with Src Kinase: IMPLICATIONS FOR ASTROCYTE DEVELOPMENT, ACTIVATION, AND TUMOR GROWTH." *J Biol Chem* 284(13): 8797-8811.
- Burkhardt, K., M. Radespiel-Troger, H. D. Rupperecht, M. Goppelt-Struebe, R. Riess, L. Renders, I. A. Hauser and U. Kunzendorf** (2001). "An increase in myeloid-related protein serum levels precedes acute renal allograft rejection." *J Am Soc Nephrol* 12(9): 1947-1957.
- Burmeister, G., L. Tarcsay and C. Sorg** (1986). "Generation and characterization of a monoclonal antibody (1C5) to human migration inhibitory factor (MIF)." *Immunobiology* 171(4-5): 461-474.
- Carmona, F. J., A. Villanueva, A. Vidal, C. Munoz, S. Puertas, R. M. Penin, M. Goma, A. Lujambio, J. M. Piulats, R. Mesia, M. Sanchez-Céspedes, M. Manos, E. Condom, S. A. Eccles and M. Esteller** (2012). "Epigenetic disruption of cadherin-11 in human cancer metastasis." *J Pathol* 228(2): 230-240.
- Cazares, L. H., B. L. Adam, M. D. Ward, S. Nasim, P. F. Schellhammer, O. J. Semmes and G. L. Wright, Jr.** (2002). "Normal, benign, preneoplastic, and malignant prostate cells have distinct protein expression profiles resolved by surface enhanced laser desorption/ionization mass spectrometry." *Clin Cancer Res* 8(8): 2541-2552.
- Cazares, L. H., D. Troyer, S. Mendrinos, R. A. Lance, J. O. Nyalwidhe, H. A. Beydoun, M. A. Clements, R. R. Drake and O. J. Semmes** (2009). "Imaging mass spectrometry of a specific fragment of mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase kinase kinase 2 discriminates cancer from uninvolved prostate tissue." *Clin Cancer Res* 15(17): 5541-5551.
- Cha, S., Z. Song, B. J. Nikolau and E. S. Yeung** (2009). "Direct profiling and imaging of epicuticular waxes on *Arabidopsis thaliana* by laser desorption/ionization mass spectrometry using silver colloid as a matrix." *Anal Chem* 81(8): 2991-3000.
- Chambers, A. F. and L. M. Matrisian** (1997). "Changing views of the role of matrix metalloproteinases in metastasis." *J Natl Cancer Inst* 89(17): 1260-1270.
- Chang, W. C., L. C. Huang, Y. S. Wang, W. P. Peng, H. C. Chang, N. Y. Hsu, W. B. Yang and C. H. Chen** (2007). "Matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI) mechanism revisited." *Anal Chim Acta* 582(1): 1-9.
- Chaurand, P., M. E. Sanders, R. A. Jensen and R. M. Caprioli** (2004). "Proteomics in diagnostic pathology: profiling and imaging proteins directly in tissue sections." *Am J Pathol* 165(4): 1057-1068.
- Chaurand, P., S. A. Schwartz, D. Billheimer, B. J. Xu, A. Crecelius and R. M. Caprioli** (2004). "Integrating histology and imaging mass spectrometry." *Anal Chem* 76(4): 1145-1155.
- Chen, H., N. E. Paradies, M. Fedor-Chaiken and R. Brackenbury** (1997). "E-cadherin mediates adhesion and suppresses cell motility via distinct mechanisms." *J Cell Sci* 110 (Pt 3): 345-356.
- Chen, M., M. Sinha, B. A. Luxon, A. R. Bresnick and K. L. O'Connor** (2009). "Integrin alpha6beta4 controls the expression of genes associated with cell motility, invasion, and metastasis, including S100A4/metastasin." *J Biol Chem* 284(3): 1484-1494.
- Cheng, P., C. A. Corzo, N. Luetkeke, B. Yu, S. Nagaraj, M. M. Bui, M. Ortiz, W. Nacken, C. Sorg, T. Vogl, J. Roth and D. I. Gabrilovich** (2008). "Inhibition of dendritic cell differentiation and accumulation of myeloid-derived suppressor cells in cancer is regulated by S100A9 protein." *J Exp Med* 205(10): 2235-2249.
- Choi, K. S., D. K. Fogg, C. S. Yoon and D. M. Waisman** (2003). "p11 regulates extracellular plasmin production and invasiveness of HT1080 fibrosarcoma cells." *FASEB J* 17(2): 235-246.
- Crawford, H. C. and L. M. Matrisian** (1994). "Tumor and stromal expression of matrix metalloproteinases and their role in tumor progression." *Invasion Metastasis* 14(1-6): 234-245.
- Crecelius, A. C., D. S. Cornett, R. M. Caprioli, B. Williams, B. M. Dawant and B. Bodenheimer** (2005). "Three-dimensional visualization of protein expression in mouse brain structures using imaging mass spectrometry." *J Am Soc Mass Spectrom* 16(7): 1093-1099.
- Creutz, C. E., C. J. Pazoles and H. B. Pollard** (1978). "Identification and purification of an adrenal medullary protein (synexin) that causes calcium-dependent aggregation of isolated chromaffin granules." *J Biol Chem* 253(8): 2858-2866.
- Creutz, C. E., W. J. Zaks, H. C. Hamman, S. Crane, W. H. Martin, K. L. Gould, K. M. Oddie and S. J. Parsons** (1987). "Identification of chromaffin granule-binding proteins. Relationship of the chromobindins to calelectrin, synhibin, and the tyrosine kinase substrates p35 and p36." *J Biol Chem* 262(4): 1860-1868.

- Cross, S. S., F. C. Hamdy, J. C. Deloulme and I. Rehman** (2005). "Expression of S100 proteins in normal human tissues and common cancers using tissue microarrays: S100A6, S100A8, S100A9 and S100A11 are all overexpressed in common cancers." *Histopathology* 46(3): 256-269.
- Crumpton, M. J. and J. R. Dedman** (1990). "Protein terminology tangle." *Nature* 345(6272): 212.
- Davey, G. E., P. Murmann and C. W. Heizmann** (2001). "Intracellular Ca²⁺ and Zn²⁺ levels regulate the alternative cell density-dependent secretion of S100B in human glioblastoma cells." *J Biol Chem* 276(33): 30819-30826.
- Dazard, J. E., H. Gal, N. Amariglio, G. Rechavi, E. Domany and D. Givol** (2003). "Genome-wide comparison of human keratinocyte and squamous cell carcinoma responses to UVB irradiation: implications for skin and epithelial cancer." *Oncogene* 22(19): 2993-3006.
- De Meyer, S., Z. J. Gong, W. Suwandhi, J. van Pelt, A. Soumillion and S. H. Yap** (1997). "Organ and species specificity of hepatitis B virus (HBV) infection: a review of literature with a special reference to preferential attachment of HBV to human hepatocytes." *J Viral Hepat* 4(3): 145-153.
- Deininger, S. O., M. P. Ebert, A. Futterer, M. Gerhard and C. Rocken** (2008). "MALDI imaging combined with hierarchical clustering as a new tool for the interpretation of complex human cancers." *J Proteome Res* 7(12): 5230-5236.
- Delabie, J., C. de Wolf-Peeters, J. J. van den Oord and V. J. Desmet** (1990). "Differential expression of the calcium-binding proteins MRP8 and MRP14 in granulomatous conditions: an immunohistochemical study." *Clin Exp Immunol* 81(1): 123-126.
- Delaney, J. T., A. Urbanek, L. Wehder, J. Perelaer, A. C. Crecelius, F. von Eggeling and U. S. Schubert** (2011). "Combinatorial optimization of multiple MALDI matrices on a single tissue sample using inkjet printing." *ACS Comb Sci* 13(3): 218-222.
- Deng, H., R. F. Guo, W. M. Li, M. Zhao and Y. Y. Lu** (2005). "Matrix metalloproteinase 11 depletion inhibits cell proliferation in gastric cancer cells." *Biochem Biophys Res Commun* 326(2): 274-281.
- Denys, H., O. De Wever, B. Nusgens, Y. Kong, R. Sciote, A. T. Le, K. Van Dam, A. Jadidizadeh, S. Tejpar, M. Mareel, B. Alman and J. J. Cassiman** (2004). "Invasion and MMP expression profile in desmoid tumours." *Br J Cancer* 90(7): 1443-1449.
- Deutskens, F., J. Yang and R. M. Caprioli** (2011). "High spatial resolution imaging mass spectrometry and classical histology on a single tissue section." *J Mass Spectrom* 46(6): 568-571.
- Diederichs, S., E. Bulk, B. Steffen, P. Ji, L. Tickenbrock, K. Lang, K. S. Zanker, R. Metzger, P. M. Schneider, V. Gerke, M. Thomas, W. E. Berdel, H. Serve and C. Muller-Tidow** (2004). "S100 family members and trypsinogens are predictors of distant metastasis and survival in early-stage non-small cell lung cancer." *Cancer Res* 64(16): 5564-5569.
- Domon, M., M. N. Nasir, G. Matar, S. Pikula, F. Besson and J. Bandorowicz-Pikula** (2012). "Annexins as organizers of cholesterol- and sphingomyelin-enriched membrane microdomains in Niemann-Pick type C disease." *Cell Mol Life Sci* 69(11): 1773-1785.
- Donato, R.** (1986). "S-100 proteins." *Cell Calcium* 7(3): 123-145.
- Donato, R.** (1991). "Perspectives in S-100 protein biology. Review article." *Cell Calcium* 12(10): 713-726.
- Donato, R.** (2001). "S100: a multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles." *Int J Biochem Cell Biol* 33(7): 637-668.
- Donato, R.** (2003). "Intracellular and extracellular roles of S100 proteins." *Microsc Res Tech* 60(6): 540-551.
- Donato, R.** (2007). "RAGE: a single receptor for several ligands and different cellular responses: the case of certain S100 proteins." *Curr Mol Med* 7(8): 711-724.
- Draeger, A., K. Monastyrskaya and E. B. Babiychuk** (2011). "Plasma membrane repair and cellular damage control: the annexin survival kit." *Biochem Pharmacol* 81(6): 703-712.
- Dubois, T., J. P. Oudinet, J. P. Mira and F. Russo-Marie** (1996). "Annexins and protein kinases C." *Biochim Biophys Acta* 1313(3): 290-294.
- Eberhard, D. K., L. R.; VandenBerg, S. R.; Creutz, C. E.** (2001). "Control of the nuclear-cytoplasmic partitioning of annexin II by a nuclear export signal and by p11 binding." *J Cell Sci. Sep;114(Pt 17):* 3155-3166.
- Eckert, R. L., A. M. Broome, M. Ruse, N. Robinson, D. Ryan and K. Lee** (2004). "S100 proteins in the epidermis." *J Invest Dermatol* 123(1): 23-33.

- ED, H.** (1968). "Organization and fine structure of epithelium and mesenchyme in the developing chick embryo."
- Eggers, K., K. Sikora, M. Lorenz, T. Taubert, M. Moobed, G. Baumann, K. Stangl and V. Stangl** (2011). "RAGE-dependent regulation of calcium-binding proteins S100A8 and S100A9 in human THP-1." *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 119(6): 353-357.
- El Ayed, M., D. Bonnel, R. Longuespee, C. Castelier, J. Franck, D. Vergara, A. Desmons, A. Tasiemski, A. Kenani, D. Vinatier, R. Day, I. Fournier and M. Salzet** (2010). "MALDI imaging mass spectrometry in ovarian cancer for tracking, identifying, and validating biomarkers." *Med Sci Monit* 16(8): BR233-245.
- Emberley, E. D., L. C. Murphy and P. H. Watson** (2004). "S100 proteins and their influence on pro-survival pathways in cancer." *Biochem Cell Biol* 82(4): 508-515.
- Engelkamp, D., B. W. Schafer, M. G. Mattei, P. Erne and C. W. Heizmann** (1993). "Six S100 genes are clustered on human chromosome 1q21: identification of two genes coding for the two previously unreported calcium-binding proteins S100D and S100E." *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(14): 6547-6551.
- Engers, R. and H. E. Gabbert** (2000). "Mechanisms of tumor metastasis: cell biological aspects and clinical implications." *J Cancer Res Clin Oncol* 126(12): 682-692.
- Escher, N., G. Ernst, C. Melle, A. Berndt, J. H. Clement, K. Junker, K. Friedrich, O. Guntinas-Lichius and F. von Eggeling** (2010). "Comparative proteomic analysis of normal and tumor stromal cells by tissue on chip based mass spectrometry (toc-MS)." *Diagn Pathol* 5: 10.
- Escher, N., B. Spies-Weishart, M. Kaatz, C. Melle, A. Bleul, D. Driesch, U. Wollina and F. von Eggeling** (2006). "Identification of HNP3 as a tumour marker in CD4+ and CD4- lymphocytes of patients with cutaneous T-cell lymphoma." *Eur J Cancer* 42(2): 249-255.
- Eue, I., B. Pietz, J. Storck, M. Klempt and C. Sorg** (2000). "Transendothelial migration of 27E10+ human monocytes." *Int Immunol* 12(11): 1593-1604.
- EW, G. C. a. T.** (1996). "The epithelial to mesenchymal transition and metastatic progression in carcinoma." *Breast J* 2: 83-96.
- Faried, A., L. S. Faried, H. Kimura, M. Nakajima, M. Sohda, T. Miyazaki, H. Kato, N. Usman and H. Kuwano** (2006). "RhoA and RhoC proteins promote both cell proliferation and cell invasion of human oesophageal squamous cell carcinoma cell lines in vitro and in vivo." *Eur J Cancer* 42(10): 1455-1465.
- Fatimathas, L. and S. E. Moss** (2010). "Annexins as disease modifiers." *Histol Histopathol* 25(4): 527-532.
- Fernandez, J. A., B. Ochoa, O. Fresnedo, M. T. Giralt and R. Rodriguez-Puertas** (2011). "Matrix-assisted laser desorption ionization imaging mass spectrometry in lipidomics." *Anal Bioanal Chem* 401(1): 29-51.
- Fernandez, M. P., R. O. Morgan, M. R. Fernandez and M. T. Carcedo** (1994). "The gene encoding human annexin V has a TATA-less promoter with a high G+C content." *Gene* 149(2): 253-260.
- Flower, R. J.** (1986). "Background and discovery of lipocortins." *Agents Actions* 17(3-4): 255-262.
- Foell, D., H. Wittkowski, T. Vogl and J. Roth** (2007). "S100 proteins expressed in phagocytes: a novel group of damage-associated molecular pattern molecules." *J Leukoc Biol* 81(1): 28-37.
- Franck, J., M. El Ayed, M. Wisztorski, M. Salzet and I. Fournier** (2009). "On-tissue N-terminal peptide derivatizations for enhancing protein identification in MALDI mass spectrometric imaging strategies." *Anal Chem* 81(20): 8305-8317.
- Franck, J., R. Longuespee, M. Wisztorski, A. Van Remoortere, R. Van Zeijl, A. Deelder, M. Salzet, L. McDonnell and I. Fournier** (2010). "MALDI mass spectrometry imaging of proteins exceeding 30,000 daltons." *Med Sci Monit* 16(9): BR293-299.
- Frixen, U. H., J. Behrens, M. Sachs, G. Eberle, B. Voss, A. Warda, D. Lochner and W. Birchmeier** (1991). "E-cadherin-mediated cell-cell adhesion prevents invasiveness of human carcinoma cells." *J Cell Biol* 113(1): 173-185.
- Frosch, M., A. Strey, T. Vogl, N. M. Wulffraat, W. Kuis, C. Sunderkotter, E. Harms, C. Sorg and J. Roth** (2000). "Myeloid-related proteins 8 and 14 are specifically secreted during interaction of phagocytes and activated endothelium and are useful markers for monitoring disease activity in pauciarticular-onset juvenile rheumatoid arthritis." *Arthritis Rheum* 43(3): 628-637.
- Futter, C. E. and I. J. White** (2007). "Annexins and endocytosis." *Traffic* 8(8): 951-958.
- Gabbert, H. E., W. Mueller, A. Schneiders, S. Meier, R. Moll, W. Birchmeier and G. Hommel** (1996). "Prognostic value of E-cadherin expression in 413 gastric carcinomas." *Int J Cancer* 69(3): 184-189.

- Garbuglia, M., M. Verzini, R. V. Dimlich, G. A. Jamieson, Jr. and R. Donato** (1996). "Characterization of type III intermediate filament regulatory protein target epitopes: S-100 (beta and/or alpha) binds the N-terminal head domain; annexin II2-p11(2) binds the rod domain." *Biochim Biophys Acta* 1313(3): 268-276.
- Garrett, S. C., K. M. Varney, D. J. Weber and A. R. Bresnick** (2006). "S100A4, a mediator of metastasis." *J Biol Chem* 281(2): 677-680.
- Gebhardt, C., U. Breitenbach, J. P. Tuckermann, B. T. Dittrich, K. H. Richter and P. Angel** (2002). "Calgranulins S100A8 and S100A9 are negatively regulated by glucocorticoids in a c-Fos-dependent manner and overexpressed throughout skin carcinogenesis." *Oncogene* 21(27): 4266-4276.
- Gebhardt, C., J. Nemeth, P. Angel and J. Hess** (2006). "S100A8 and S100A9 in inflammation and cancer." *Biochem Pharmacol* 72(11): 1622-1631.
- Geisow, M. J.** (1986). "Common domain structure of Ca²⁺ and lipid-binding proteins." *FEBS Lett* 203(1): 99-103.
- Gerke, V.** (2001). "Annexins And Membrane Organisation In The Endocytic Pathway." *Cell Mol Biol Lett* 6(2): 204.
- Gerke, V., C. E. Creutz and S. E. Moss** (2005). "Annexins: linking Ca²⁺ signalling to membrane dynamics." *Nat Rev Mol Cell Biol* 6(6): 449-461.
- Gerke, V. and S. E. Moss** (2002). "Annexins: from structure to function." *Physiol Rev* 82(2): 331-371.
- Ghavami, S., S. Chitayat, M. Hashemi, M. Eshraghi, W. J. Chazin, A. J. Halayko and C. Kerkhoff** (2009). "S100A8/A9: a Janus-faced molecule in cancer therapy and tumorigenesis." *Eur J Pharmacol* 625(1-3): 73-83.
- Ghavami, S., I. Rashedi, B. M. Dattilo, M. Eshraghi, W. J. Chazin, M. Hashemi, S. Wesselborg, C. Kerkhoff and M. Los** (2008). "S100A8/A9 at low concentration promotes tumor cell growth via RAGE ligation and MAP kinase-dependent pathway." *J Leukoc Biol* 83(6): 1484-1492.
- Ghellal, A., C. Li, M. Hayes, G. Byrne, N. Bundred and S. Kumar** (2000). "Prognostic significance of TGF beta 1 and TGF beta 3 in human breast carcinoma." *Anticancer Res* 20(6B): 4413-4418.
- Giancotti, F. G.** (2007). "Targeting integrin beta4 for cancer and anti-angiogenic therapy." *Trends Pharmacol Sci* 28(10): 506-511.
- Giancotti, F. G. and E. Ruoslahti** (1999). "Integrin signaling." *Science* 285(5430): 1028-1032.
- Gill, J. H., I. G. Kirwan, J. M. Seargent, S. W. Martin, S. Tijani, V. A. Anikin, A. J. Mearns, M. C. Bibby, A. Anthoney and P. M. Loadman** (2004). "MMP-10 is overexpressed, proteolytically active, and a potential target for therapeutic intervention in human lung carcinomas." *Neoplasia* 6(6): 777-785.
- Glenney, J. R., Jr., B. Tack and M. A. Powell** (1987). "Calpactins: two distinct Ca⁺⁺-regulated phospholipid- and actin-binding proteins isolated from lung and placenta." *J Cell Biol* 104(3): 503-511.
- Gould Rothberg, B. E. and M. B. Bracken** (2006). "E-cadherin immunohistochemical expression as a prognostic factor in infiltrating ductal carcinoma of the breast: a systematic review and meta-analysis." *Breast Cancer Res Treat* 100(2): 139-148.
- Goyette, J. and C. L. Geczy** (2011). "Inflammation-associated S100 proteins: new mechanisms that regulate function." *Amino Acids* 41(4): 821-842.
- Guerreiro Da Silva, I. D., Y. F. Hu, I. H. Russo, X. Ao, A. M. Salicioni, X. Yang and J. Russo** (2000). "S100P calcium-binding protein overexpression is associated with immortalization of human breast epithelial cells in vitro and early stages of breast cancer development in vivo." *Int J Oncol* 16(2): 231-240.
- Gultekin, H. and K. H. Heermann** (1988). "The use of polyvinylidenedifluoride membranes as a general blotting matrix." *Anal Biochem* 172(2): 320-329.
- Gygi, S. P., Y. Rochon, B. R. Franza and R. Aebersold** (1999). "Correlation between protein and mRNA abundance in yeast." *Mol Cell Biol* 19(3): 1720-1730.
- Hamm, G., V. Carre, A. Poutaraud, B. Maunit, G. Frache, D. Merdinoglu and J. F. Muller** (2010). "Determination and imaging of metabolites from *Vitis vinifera* leaves by laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry." *Rapid Commun Mass Spectrom* 24(3): 335-342.
- Hamon, Y., C. Broccardo, O. Chambenoit, M. F. Luciani, F. Toti, S. Chaslin, J. M. Freyssinet, P. F. Devaux, J. McNeish, D. Marguet and G. Chimini** (2000). "ABC1 promotes engulfment of apoptotic cells and transbilayer redistribution of phosphatidylserine." *Nat Cell Biol* 2(7): 399-406.
- Han, J. Y., H. S. Kim, S. H. Lee, W. S. Park, J. Y. Lee and N. J. Yoo** (2003). "Immunohistochemical expression of integrins and extracellular matrix proteins in non-small cell lung cancer: correlation with lymph node metastasis." *Lung Cancer* 41(1): 65-70.

- Hawkins, T. E., D. Das, B. Young and S. E. Moss** (2002). "DT40 cells lacking the Ca²⁺-binding protein annexin 5 are resistant to Ca²⁺-dependent apoptosis." *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(12): 8054-8059.
- Hayasaka, T., N. Goto-Inoue, N. Zaima, K. Shrivasa, Y. Kashiwagi, M. Yamamoto, M. Nakamoto and M. Setou** (2010). "Imaging mass spectrometry with silver nanoparticles reveals the distribution of fatty acids in mouse retinal sections." *J Am Soc Mass Spectrom* 21(8): 1446-1454.
- Hayes, M. J., R. E. Longbottom, M. A. Evans and S. E. Moss** (2007). "Annexinopathies." *Subcell Biochem* 45: 1-28.
- Heizmann, C. W., G. E. Ackermann and A. Galichet** (2007). "Pathologies involving the S100 proteins and RAGE." *Subcell Biochem* 45: 93-138.
- Heizmann, C. W., G. Fritz and B. W. Schafer** (2002). "S100 proteins: structure, functions and pathology." *Front Biosci* 7: d1356-1368.
- Hermani, A., B. De Servi, S. Medunjanin, P. A. Tessier and D. Mayer** (2006). "S100A8 and S100A9 activate MAP kinase and NF-kappaB signaling pathways and trigger translocation of RAGE in human prostate cancer cells." *Exp Cell Res* 312(2): 184-197.
- Hermani, A., J. Hess, B. De Servi, S. Medunjanin, R. Grobholz, L. Trojan, P. Angel and D. Mayer** (2005). "Calcium-binding proteins S100A8 and S100A9 as novel diagnostic markers in human prostate cancer." *Clin Cancer Res* 11(14): 5146-5152.
- Hermann, A., R. Donato, T. M. Weiger and W. J. Chazin** (2012). "S100 calcium binding proteins and ion channels." *Front Pharmacol* 3: 67.
- Hessian, P. A., J. Edgeworth and N. Hogg** (1993). "MRP-8 and MRP-14, two abundant Ca(2+)-binding proteins of neutrophils and monocytes." *J Leukoc Biol* 53(2): 197-204.
- Hiratsuka, S., A. Watanabe, H. Aburatani and Y. Maru** (2006). "Tumour-mediated upregulation of chemoattractants and recruitment of myeloid cells predetermines lung metastasis." *Nat Cell Biol* 8(12): 1369-1375.
- Honkavuori, M., A. Talvensaaari-Mattila, Y. Soini, T. Turpeenniemi-Hujanen and M. Santala** (2007). "MMP-2 expression associates with CA 125 and clinical course in endometrial carcinoma." *Gynecol Oncol* 104(1): 217-221.
- Hoppmann, S., J. Steinbach and J. Pietzsch** (2010). "Scavenger receptors are associated with cellular interactions of S100A12 in vitro and in vivo." *Int J Biochem Cell Biol* 42(5): 651-661.
- Hou, Y., L. Yang, M. Mou, Y. Hou, A. Zhang, N. Pan, R. Qiang, L. Wei and N. Zhang** (2008). "Annexin A2 regulates the levels of plasmin, S100A10 and Fascin in L5178Y cells." *Cancer Invest* 26(8): 809-815.
- Hough, C. D., K. R. Cho, A. B. Zonderman, D. R. Schwartz and P. J. Morin** (2001). "Coordinately up-regulated genes in ovarian cancer." *Cancer Res* 61(10): 3869-3876.
- Hourihan, R. N., G. C. O'Sullivan and J. G. Morgan** (2003). "Transcriptional gene expression profiles of oesophageal adenocarcinoma and normal oesophageal tissues." *Anticancer Res* 23(1A): 161-165.
- Hoyal, C. R., A. P. Thomas and H. J. Forman** (1996). "Hydroperoxide-induced increases in intracellular calcium due to annexin VI translocation and inactivation of plasma membrane Ca²⁺-ATPase." *J Biol Chem* 271(46): 29205-29210.
- Hsieh, H. L., B. W. Schafer, N. Sasaki and C. W. Heizmann** (2003). "Expression analysis of S100 proteins and RAGE in human tumors using tissue microarrays." *Biochem Biophys Res Commun* 307(2): 375-381.
- Hsu, K., R. J. Passey, Y. Endoh, F. Rahimi, P. Youssef, T. Yen and C. L. Geczy** (2005). "Regulation of S100A8 by glucocorticoids." *J Immunol* 174(4): 2318-2326.
- Huber, R., R. Berendes, A. Burger, M. Schneider, A. Karshikov, H. Luecke, J. Romisch and E. Paques** (1992). "Crystal and molecular structure of human annexin V after refinement. Implications for structure, membrane binding and ion channel formation of the annexin family of proteins." *J Mol Biol* 223(3): 683-704.
- Huber, R., M. Schneider, I. Mayr, J. Romisch and E. P. Paques** (1990). "The calcium binding sites in human annexin V by crystal structure analysis at 2.0 Å resolution. Implications for membrane binding and calcium channel activity." *FEBS Lett* 275(1-2): 15-21.
- Hummerich, L., R. Muller, J. Hess, F. Kokocinski, M. Hahn, G. Furstenberger, C. Mauch, P. Lichter and P. Angel** (2006). "Identification of novel tumour-associated genes differentially expressed in the process of squamous cell cancer development." *Oncogene* 25(1): 111-121.

- Hutchens TW, Y. T.** (1993). "New desorption strategies for the mass spectrometric analysis of macromolecules." *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 7: 576-780.
- Iida, J., K. L. Wilhelmson, M. A. Price, C. M. Wilson, D. Pei, L. T. Furcht and J. B. McCarthy** (2004). "Membrane type-1 matrix metalloproteinase promotes human melanoma invasion and growth." *J Invest Dermatol* 122(1): 167-176.
- Ilg, E. C., B. W. Schafer and C. W. Heizmann** (1996). "Expression pattern of S100 calcium-binding proteins in human tumors." *Int J Cancer* 68(3): 325-332.
- Inaba, N., N. Sato, M. Ijichi, I. Fukazawa, A. Nito, H. Takamizawa, G. Luben and H. Bohn** (1984). "The immunocytochemical location of two membrane-associated placental tissue proteins in human and cynomolgus monkey placentae." *Tumour Biol* 5(2): 75-85.
- Isas, J. M., J. P. Cartailier, Y. Sokolov, D. R. Patel, R. Langen, H. Luecke, J. E. Hall and H. T. Haigler** (2000). "Annexins V and XII insert into bilayers at mildly acidic pH and form ion channels." *Biochemistry* 39(11): 3015-3022.
- Iwasaki, A., M. Suda, H. Nakao, T. Nagoya, Y. Saino, K. Arai, T. Mizoguchi, F. Sato, H. Yoshizaki, M. Hirata and et al.** (1987). "Structure and expression of cDNA for an inhibitor of blood coagulation isolated from human placenta: a new lipocortin-like protein." *J Biochem* 102(5): 1261-1273.
- Jakowlew, S. B., J. M. Mariano, L. You and A. Mathias** (1997). "Differential regulation of protease and extracellular matrix protein expression by transforming growth factor-beta 1 in non-small cell lung cancer cells and normal human bronchial epithelial cells." *Biochim Biophys Acta* 1353(2): 157-170.
- Jamieson, N. B., C. R. Carter, C. J. McKay and K. A. Oien** (2011). "Tissue biomarkers for prognosis in pancreatic ductal adenocarcinoma: a systematic review and meta-analysis." *Clin Cancer Res* 17(10): 3316-3331.
- Jaskolla, T. W., M. Karas, U. Roth, K. Steinert, C. Menzel and K. Reihs** (2009). "Comparison between vacuum sublimed matrices and conventional dried droplet preparation in MALDI-TOF mass spectrometry." *J Am Soc Mass Spectrom* 20(6): 1104-1114.
- Ji, J., L. Zhao, X. Wang, C. Zhou, F. Ding, L. Su, C. Zhang, X. Mao, M. Wu and Z. Liu** (2004). "Differential expression of S100 gene family in human esophageal squamous cell carcinoma." *J Cancer Res Clin Oncol* 130(8): 480-486.
- Jr, G. W., L. H. Cazares, S. M. Leung, S. Nasim, B. L. Adam, T. T. Yip, P. F. Schellhammer, L. Gong and A. Vlahou** (1999). "Proteinchip(R) surface enhanced laser desorption/ionization (SELDI) mass spectrometry: a novel protein biochip technology for detection of prostate cancer biomarkers in complex protein mixtures." *Prostate Cancer Prostatic Dis* 2(5/6): 264-276.
- Jurchen, J. C., S. S. Rubakhin and J. V. Sweedler** (2005). "MALDI-MS imaging of features smaller than the size of the laser beam." *J Am Soc Mass Spectrom* 16(10): 1654-1659.
- Kaletas, B. K., I. M. van der Wiel, J. Stauber, J. D. Lennard, C. Guzel, J. M. Kros, T. M. Luider and R. M. Heeren** (2009). "Sample preparation issues for tissue imaging by imaging MS." *Proteomics* 9(10): 2622-2633.
- Kalluri, R. and R. A. Weinberg** (2009). "The basics of epithelial-mesenchymal transition." *J Clin Invest* 119(6): 1420-1428.
- Kanai, Y., T. Oda, H. Tsuda, A. Ochiai and S. Hirohashi** (1994). "Point mutation of the E-cadherin gene in invasive lobular carcinoma of the breast." *Jpn J Cancer Res* 85(10): 1035-1039.
- Kanamori, T., K. Takakura, M. Mandai, M. Kariya, K. Fukuhara, M. Sakaguchi, N. H. Huh, K. Saito, T. Sakurai, J. Fujita and S. Fujii** (2004). "Increased expression of calcium-binding protein S100 in human uterine smooth muscle tumours." *Mol Hum Reprod* 10(10): 735-742.
- Kang, Y. and J. Massague** (2004). "Epithelial-mesenchymal transitions: twist in development and metastasis." *Cell* 118(3): 277-279.
- Kaplan, R., M. Jaye, W. H. Burgess, D. D. Schlaepfer and H. T. Haigler** (1988). "Cloning and expression of cDNA for human endonexin II, a Ca²⁺ and phospholipid binding protein." *J Biol Chem* 263(17): 8037-8043.
- Karas, M. and F. Hillenkamp** (1988). "Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons." *Anal Chem* 60(20): 2299-2301.
- Karas, M. and R. Kruger** (2003). "Ion formation in MALDI: the cluster ionization mechanism." *Chem Rev* 103(2): 427-440.
- Kawasaki, H., S. Nakayama and R. H. Kretsinger** (1998). "Classification and evolution of EF-hand proteins." *Biometals* 11(4): 277-295.

- Keely, P. J., J. K. Westwick, I. P. Whitehead, C. J. Der and L. V. Parise** (1997). "Cdc42 and Rac1 induce integrin-mediated cell motility and invasiveness through PI(3)K." *Nature* 390(6660): 632-636.
- Kelly, S. E., D. B. Jones and S. Fleming** (1989). "Calgranulin expression in inflammatory dermatoses." *J Pathol* 159(1): 17-21.
- Kemler, R.** (1993). "From cadherins to catenins: cytoplasmic protein interactions and regulation of cell adhesion." *Trends Genet* 9(9): 317-321.
- Kenis, H., L. Hofstra and C. P. Reutelingsperger** (2007). "Annexin A5: shifting from a diagnostic towards a therapeutic realm." *Cell Mol Life Sci* 64(22): 2859-2862.
- Kerkhoff, C., H. A. Hofmann, J. Vormoor, H. Melkonyan, J. Roth, C. Sorg and M. Klempt** (2002). "Binding of two nuclear complexes to a novel regulatory element within the human S100A9 promoter drives the S100A9 gene expression." *J Biol Chem* 277(44): 41879-41887.
- Kerkhoff, C., M. Klempt, V. Kaever and C. Sorg** (1999). "The two calcium-binding proteins, S100A8 and S100A9, are involved in the metabolism of arachidonic acid in human neutrophils." *J Biol Chem* 274(46): 32672-32679.
- Kerkhoff, C., M. Klempt and C. Sorg** (1998). "Novel insights into structure and function of MRP8 (S100A8) and MRP14 (S100A9)." *Biochim Biophys Acta* 1448(2): 200-211.
- Kettunen, E., S. Anttila, J. K. Seppanen, A. Karjalainen, H. Edgren, I. Lindstrom, R. Salovaara, A. M. Nissen, J. Salo, K. Mattson, J. Hollmen, S. Knuutila and H. Wikman** (2004). "Differentially expressed genes in nonsmall cell lung cancer: expression profiling of cancer-related genes in squamous cell lung cancer." *Cancer Genet Cytogenet* 149(2): 98-106.
- Khatib-Shahidi, S., M. Andersson, J. L. Herman, T. A. Gillespie and R. M. Caprioli** (2006). "Direct molecular analysis of whole-body animal tissue sections by imaging MALDI mass spectrometry." *Anal Chem* 78(18): 6448-6456.
- Kheifets, V., R. Bright, K. Inagaki, D. Schechtman and D. Mochly-Rosen** (2006). "Protein kinase C delta (deltaPKC)-annexin V interaction: a required step in deltaPKC translocation and function." *J Biol Chem* 281(32): 23218-23226.
- Kim, H. K., M. L. Reyzer, I. J. Choi, C. G. Kim, H. S. Kim, A. Oshima, O. Chertov, S. Colantonio, R. J. Fisher, J. L. Allen, R. M. Caprioli and J. E. Green** (2010). "Gastric cancer-specific protein profile identified using endoscopic biopsy samples via MALDI mass spectrometry." *J Proteome Res* 9(8): 4123-4130.
- Kirsch, T. and R. E. Wuthier** (1994). "Stimulation of calcification of growth plate cartilage matrix vesicles by binding to type II and X collagens." *J Biol Chem* 269(15): 11462-11469.
- Kleer, C. G., K. A. Griffith, M. S. Sabel, G. Gallagher, K. L. van Golen, Z. F. Wu and S. D. Merajver** (2005). "RhoC-GTPase is a novel tissue biomarker associated with biologically aggressive carcinomas of the breast." *Breast Cancer Res Treat* 93(2): 101-110.
- Kleer, C. G., T. N. Teknos, M. Islam, B. Marcus, J. S. Lee, Q. Pan and S. D. Merajver** (2006). "RhoC GTPase expression as a potential marker of lymph node metastasis in squamous cell carcinomas of the head and neck." *Clin Cancer Res* 12(15): 4485-4490.
- Klingelhofer, J., H. D. Moller, E. U. Sumer, C. H. Berg, M. Poulsen, D. Kiryushko, V. Soroka, N. Ambartsumian, M. Grigorian and E. M. Lukanidin** (2009). "Epidermal growth factor receptor ligands as new extracellular targets for the metastasis-promoting S100A4 protein." *FEBS J* 276(20): 5936-5948.
- Knochenmuss, R.** (2003). "A quantitative model of ultraviolet matrix-assisted laser desorption/ionization including analyte ion generation." *Anal Chem* 75(10): 2199-2207.
- Kobel, M., S. E. Kalloger, N. Boyd, S. McKinney, E. Mehl, C. Palmer, S. Leung, N. J. Bowen, D. N. Ionescu, A. Rajput, L. M. Prentice, D. Miller, J. Santos, K. Swenerton, C. B. Gilks and D. Huntsman** (2008). "Ovarian carcinoma subtypes are different diseases: implications for biomarker studies." *PLoS Med* 5(12): e232.
- Kondo, A., M. Sakaguchi, E. Makino, M. Namba, S. Okada and N. H. Huh** (2002). "Localization of S100C immunoreactivity in various human tissues." *Acta Med Okayama* 56(1): 31-34.
- Kretsinger, R. H., S. E. Rudnick and L. J. Weissman** (1986). "Crystal structure of calmodulin." *J Inorg Biochem* 28(2-3): 289-302.
- Kristiansen, G., Y. Yu, K. Schluns, C. Sers, M. Dietel and I. Petersen** (2003). "Expression of the cell adhesion molecule CD146/MCAM in non-small cell lung cancer." *Anal Cell Pathol* 25(2): 77-81.
- Kubista, H., T. E. Hawkins, D. R. Patel, H. T. Haigler and S. E. Moss** (1999). "Annexin 5 mediates a peroxide-induced Ca(2+) influx in B cells." *Curr Biol* 9(23): 1403-1406.

- Kunz, M., J. Roth, C. Sorg and G. Kolde** (1992). "Epidermal expression of the calcium binding surface antigen 27E10 in inflammatory skin diseases." *Arch Dermatol Res* 284(7): 386-390.
- Kusama, T., M. Mukai, H. Endo, O. Ishikawa, M. Tatsuta, H. Nakamura and M. Inoue** (2006). "Inactivation of Rho GTPases by p190 RhoGAP reduces human pancreatic cancer cell invasion and metastasis." *Cancer Sci* 97(9): 848-853.
- Kyriazanos, I. D., M. Tachibana, D. K. Dhar, M. Shibakita, T. Ono, H. Kohno and N. Nagasue** (2002). "Expression and prognostic significance of S100A2 protein in squamous cell carcinoma of the esophagus." *Oncol Rep* 9(3): 503-510.
- Laemmli, U. K.** (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* 227(5259): 680-685.
- Lagasse, E. and R. G. Clerc** (1988). "Cloning and expression of two human genes encoding calcium-binding proteins that are regulated during myeloid differentiation." *Mol Cell Biol* 8(6): 2402-2410.
- Lechene, C., F. Hillion, G. McMahon, D. Benson, A. M. Kleinfeld, J. P. Kampf, D. Distel, Y. Luyten, J. Bonventre, D. Hentschel, K. M. Park, S. Ito, M. Schwartz, G. Benichou and G. Slodzian** (2006). "High-resolution quantitative imaging of mammalian and bacterial cells using stable isotope mass spectrometry." *J Biol* 5(6): 20.
- Leclerc, E., G. Fritz, S. W. Vetter and C. W. Heizmann** (2009). "Binding of S100 proteins to RAGE: an update." *Biochim Biophys Acta* 1793(6): 993-1007.
- Lee, H. J. and D. Y. Jo** (2012). "The role of the CXCR4/CXCL12 axis and its clinical implications in gastric cancer." *Histol Histopathol* 27(9): 1155-1161.
- Lehmann K, B. A., Gotte T, Ramseyer K, Wiedenbeck M** (2009). " Growth related zonations in authigenic and hydrothermal quartz characterized by SIMS-, EPMA-, SEM-CL- and SEM-CCimaging." *Mineral Mag* 73(633).
- Leist, M. and P. Nicotera** (1997). "The shape of cell death." *Biochem Biophys Res Commun* 236(1): 1-9.
- Letterio, J. J. and A. B. Roberts** (1998). "Regulation of immune responses by TGF-beta." *Annu Rev Immunol* 16: 137-161.
- Leukert, N., T. Vogl, K. Strupat, R. Reichelt, C. Sorg and J. Roth** (2006). "Calcium-dependent tetramer formation of S100A8 and S100A9 is essential for biological activity." *J Mol Biol* 359(4): 961-972.
- Lewis WG, S. Z., Finn MG, Siuzdak G** (2003). "Desorption/ionization on silicon (DIOS) mass spectrometry: background and applications." *Int J Mass Spectrom* 226(1): 107-116.
- Li, C., J. Wang, P. B. Wilson, P. Kumar, E. Levine, R. D. Hunter and S. Kumar** (1998). "Role of transforming growth factor beta3 in lymphatic metastasis in breast cancer." *Int J Cancer* 79(5): 455-459.
- Li, C., F. Zhang, M. Lin and J. Liu** (2004). "Induction of S100A9 gene expression by cytokine oncostatin M in breast cancer cells through the STAT3 signaling cascade." *Breast Cancer Res Treat* 87(2): 123-134.
- Li, Y., B. Shrestha and A. Vertes** (2007). "Atmospheric pressure molecular imaging by infrared MALDI mass spectrometry." *Anal Chem* 79(2): 523-532.
- Liang, Z., Y. Yoon, J. Votaw, M. M. Goodman, L. Williams and H. Shim** (2005). "Silencing of CXCR4 blocks breast cancer metastasis." *Cancer Res* 65(3): 967-971.
- Liebl, H.** (1967). "Ion microprobe mass analyzer." *J Appl Phys* 38(13): 5277-5283.
- Liemann, S. and R. Huber** (1997). "Three-dimensional structure of annexins." *Cell Mol Life Sci* 53(6): 516-521.
- Liemann, S. and A. Lewit-Bentley** (1995). "Annexins: a novel family of calcium- and membrane-binding proteins in search of a function." *Structure* 3(3): 233-237.
- Lim, L. H. and S. Pervaiz** (2007). "Annexin 1: the new face of an old molecule." *FASEB J* 21(4): 968-975.
- Lin, J., Q. Yang, P. T. Wilder, F. Carrier and D. J. Weber** (2010). "The calcium-binding protein S100B down-regulates p53 and apoptosis in malignant melanoma." *J Biol Chem* 285(35): 27487-27498.
- Liotta, L. A., J. Kleinerman and G. M. Saidel** (1974). "Quantitative relationships of intravascular tumor cells, tumor vessels, and pulmonary metastases following tumor implantation." *Cancer Res* 34(5): 997-1004.
- Liu, W. T., Y. L. Yang, Y. Xu, A. Lamsa, N. M. Haste, J. Y. Yang, J. Ng, D. Gonzalez, C. D. Ellermeier, P. D. Straight, P. A. Pevzner, J. Pogliano, V. Nizet, K. Pogliano and P. C. Dorrestein** (2010). "Imaging mass spectrometry of intraspecies metabolic exchange revealed the cannibalistic factors of *Bacillus subtilis*." *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(37): 16286-16290.
- Liu, Y., R. Zhang, J. Xin, Y. Sun, J. Li, D. Wei and A. Z. Zhao** (2011). "Identification of S100A16 as a novel adipogenesis promoting factor in 3T3-L1 cells." *Endocrinology* 152(3): 903-911.

- Lugering, N., R. Stoll, T. Kucharzik, G. Burmeister, C. Sorg and W. Domschke** (1995). "Serum 27E10 antigen: a new potential marker for staging HIV disease." *Clin Exp Immunol* 101(2): 249-253.
- Lundy, F. T., D. F. Orr, J. R. Gallagher, P. Maxwell, C. Shaw, S. S. Napier, C. Gerald Cowan, P. J. Lamey and J. J. Marley** (2004). "Identification and overexpression of human neutrophil alpha-defensins (human neutrophil peptides 1, 2 and 3) in squamous cell carcinomas of the human tongue." *Oral Oncol* 40(2): 139-144.
- Madsen, P., H. H. Rasmussen, H. Leffers, B. Honore and J. E. Celis** (1992). "Molecular cloning and expression of a novel keratinocyte protein (psoriasis-associated fatty acid-binding protein [PA-FABP]) that is highly up-regulated in psoriatic skin and that shares similarity to fatty acid-binding proteins." *J Invest Dermatol* 99(3): 299-305.
- Madureira, P. A., P. A. O'Connell, A. P. Surette, V. A. Miller and D. M. Waisman** (2012). "The Biochemistry and Regulation of S100A10: A Multifunctional Plasminogen Receptor Involved in Oncogenesis." *J Biomed Biotechnol* 2012: 353687.
- Maeldansmo, G. M., V. A. Florenes, T. Mellingsaeter, E. Hovig, R. S. Kerbel and O. Fodstad** (1997). "Differential expression patterns of S100A2, S100A4 and S100A6 during progression of human malignant melanoma." *Int J Cancer* 74(4): 464-469.
- Mainiero, F., C. Murgia, K. K. Wary, A. M. Curatola, A. Pepe, M. Blumemberg, J. K. Westwick, C. J. Der and F. G. Giancotti** (1997). "The coupling of alpha6beta4 integrin to Ras-MAP kinase pathways mediated by Shc controls keratinocyte proliferation." *EMBO J* 16(9): 2365-2375.
- Mandinova, A., D. Atar, B. W. Schafer, M. Spiess, U. Aebi and C. W. Heizmann** (1998). "Distinct subcellular localization of calcium binding S100 proteins in human smooth muscle cells and their relocation in response to rises in intracellular calcium." *J Cell Sci* 111 (Pt 14): 2043-2054.
- Manes, S., E. Mira, M. M. Barbacid, A. Cipres, P. Fernandez-Resa, J. M. Buesa, I. Merida, M. Aracil, G. Marquez and A. C. Martinez** (1997). "Identification of insulin-like growth factor-binding protein-1 as a potential physiological substrate for human stromelysin-3." *J Biol Chem* 272(41): 25706-25712.
- Mangahas, C. R., G. V. dela Cruz, R. J. Schneider and S. Jamal** (2004). "Endothelin-1 upregulates MCAM in melanocytes." *J Invest Dermatol* 123(6): 1135-1139.
- Mareel, M., T. Boterberg, V. Noe, L. Van Hoorde, S. Vermeulen, E. Bruyneel and M. Bracke** (1997). "E-cadherin/catenin/cytoskeleton complex: a regulator of cancer invasion." *J Cell Physiol* 173(2): 271-274.
- Marenholz, I., C. W. Heizmann and G. Fritz** (2004). "S100 proteins in mouse and man: from evolution to function and pathology (including an update of the nomenclature)." *Biochem Biophys Res Commun* 322(4): 1111-1122.
- Marguet, D., M. F. Luciani, A. Moynault, P. Williamson and G. Chimini** (1999). "Engulfment of apoptotic cells involves the redistribution of membrane phosphatidylserine on phagocyte and prey." *Nat Cell Biol* 1(7): 454-456.
- Masuda, J., E. Takayama, A. Satoh, M. Ida, T. Shinohara, K. Kojima-Aikawa, F. Ohsuzu, K. Nakanishi, K. Kuroda, M. Murakami, K. Suzuki and I. Matsumoto** (2004). "Levels of annexin IV and V in the plasma of pregnant and postpartum women." *Thromb Haemost* 91(6): 1129-1136.
- Maurer-Fogy, I., C. P. Reutelingsperger, J. Pieters, G. Bodo, C. Stratowa and R. Hauptmann** (1988). "Cloning and expression of cDNA for human vascular anticoagulant, a Ca²⁺-dependent phospholipid-binding protein." *Eur J Biochem* 174(4): 585-592.
- McDonnell, L. A., G. L. Corthals, S. M. Willems, A. van Remoortere, R. J. van Zeijl and A. M. Deelder** (2010). "Peptide and protein imaging mass spectrometry in cancer research." *J Proteomics* 73(10): 1921-1944.
- McDonnell, L. A., A. van Remoortere, N. de Velde, R. J. van Zeijl and A. M. Deelder** (2010). "Imaging mass spectrometry data reduction: automated feature identification and extraction." *J Am Soc Mass Spectrom* 21(12): 1969-1978.
- McKiernan, E., E. W. McDermott, D. Evoy, J. Crown and M. J. Duffy** (2011). "The role of S100 genes in breast cancer progression." *Tumour Biol* 32(3): 441-450.
- Meers, P., D. Daleke, K. Hong and D. Papahadjopoulos** (1991). "Interactions of annexins with membrane phospholipids." *Biochemistry* 30(11): 2903-2908.
- Meers, P. and T. Mealy** (1993). "Calcium-dependent annexin V binding to phospholipids: stoichiometry, specificity, and the role of negative charge." *Biochemistry* 32(43): 11711-11721.

- Melle, C., G. Ernst, M. Grosheva, D. N. Angelov, A. Irintchev, O. Guntinas-Lichius and F. von Eggeling** (2009). "Proteomic analysis of microdissected facial nuclei of the rat following facial nerve injury." *J Neurosci Methods* 185(1): 23-28.
- Melle, C., G. Ernst, B. Schimmel, A. Bleul, S. Koscielny, A. Wiesner, R. Bogumil, U. Moller, D. Osterloh, K. J. Halbhuber and F. von Eggeling** (2003). "Biomarker discovery and identification in laser microdissected head and neck squamous cell carcinoma with ProteinChip technology, two-dimensional gel electrophoresis, tandem mass spectrometry, and immunohistochemistry." *Mol Cell Proteomics* 2(7): 443-452.
- Melle, C., G. Ernst, B. Schimmel, A. Bleul, S. Koscielny, A. Wiesner, R. Bogumil, U. Moller, D. Osterloh, K. J. Halbhuber and F. von Eggeling** (2004). "A technical triade for proteomic identification and characterization of cancer biomarkers." *Cancer Res* 64(12): 4099-4104.
- Melle, C., G. Ernst, B. Schimmel, A. Bleul, H. Mothes, R. Kaufmann, U. Settmacher and F. Von Eggeling** (2006). "Different expression of calgizzarin (S100A11) in normal colonic epithelium, adenoma and colorectal carcinoma." *Int J Oncol* 28(1): 195-200.
- Melle, C., G. Ernst, B. Schimmel, A. Bleul, H. Thieme, R. Kaufmann, H. Mothes, U. Settmacher, U. Claussen, K. J. Halbhuber and F. Von Eggeling** (2005). "Discovery and identification of alpha-defensins as low abundant, tumor-derived serum markers in colorectal cancer." *Gastroenterology* 129(1): 66-73.
- Memon, A. A., B. S. Sorensen, P. Meldgaard, L. Fokdal, T. Thykjaer and E. Nexø** (2005). "Down-regulation of S100C is associated with bladder cancer progression and poor survival." *Clin Cancer Res* 11(2 Pt 1): 606-611.
- Merchant, M. and S. R. Weinberger** (2000). "Recent advancements in surface-enhanced laser desorption/ionization-time of flight-mass spectrometry." *Electrophoresis* 21(6): 1164-1177.
- Miller, J. P., N. Yeh, A. Vidal and A. Koff** (2007). "Interweaving the cell cycle machinery with cell differentiation." *Cell Cycle* 6(23): 2932-2938.
- Mills, L., C. Tellez, S. Huang, C. Baker, M. McCarty, L. Green, J. M. Gudas, X. Feng and M. Bar-Eli** (2002). "Fully human antibodies to MCAM/MUC18 inhibit tumor growth and metastasis of human melanoma." *Cancer Res* 62(17): 5106-5114.
- Moinzadeh, P., K. Breuhahn, H. Stutzer and P. Schirmacher** (2005). "Chromosome alterations in human hepatocellular carcinomas correlate with aetiology and histological grade--results of an explorative CGH meta-analysis." *Br J Cancer* 92(5): 935-941.
- Mollenhauer, J.** (1997). "Annexins: what are they good for?" *Cell Mol Life Sci* 53(6): 506-507.
- Mollenhauer, J., J. A. Bee, M. A. Lizarbe and K. von der Mark** (1984). "Role of anchorin CII, a 31,000-mol-wt membrane protein, in the interaction of chondrocytes with type II collagen." *J Cell Biol* 98(4): 1572-1579.
- Mollenhauer, J. and K. von der Mark** (1983). "Isolation and characterization of a collagen-binding glycoprotein from chondrocyte membranes." *EMBO J* 2(1): 45-50.
- Monroe, E. B., J. C. Jurchen, B. A. Koszczuk, J. L. Losh, S. S. Rubakhin and J. V. Sweedler** (2006). "Massively parallel sample preparation for the MALDI MS analyses of tissues." *Anal Chem* 78(19): 6826-6832.
- Monroe, E. B., J. C. Jurchen, J. Lee, S. S. Rubakhin and J. V. Sweedler** (2005). "Vitamin E imaging and localization in the neuronal membrane." *J Am Chem Soc* 127(35): 12152-12153.
- Moore, B.** (1965). "A soluble protein characteristic of the nervous system." *Biochem. Biophys. Res. Commun.* Jun, 19 (6):: 739-744.
- Moore, P. B., N. Kraus-Friedmann and J. R. Dedman** (1984). "Unique calcium-dependent hydrophobic binding proteins: possible independent mediators of intracellular calcium distinct from calmodulin." *J Cell Sci* 72: 121-133.
- Morgan, R. O., N. A. Jenkins, D. J. Gilbert, N. G. Copeland, B. R. Balsara, J. R. Testa and M. P. Fernandez** (1999). "Novel human and mouse annexin A10 are linked to the genome duplications during early chordate evolution." *Genomics* 60(1): 40-49.
- Morgan, R. O. and M. Pilar Fernandez** (1997). "Distinct annexin subfamilies in plants and protists diverged prior to animal annexins and from a common ancestor." *J Mol Evol* 44(2): 178-188.
- Moroz, O. V., G. G. Dodson, K. S. Wilson, E. Lukanidin and I. B. Bronstein** (2003). "Multiple structural states of S100A12: A key to its functional diversity." *Microsc Res Tech* 60(6): 581-592.
- Mueller, A., B. W. Schafer, S. Ferrari, M. Weibel, M. Makek, M. Hochli and C. W. Heizmann** (2005). "The calcium-binding protein S100A2 interacts with p53 and modulates its transcriptional activity." *J Biol Chem* 280(32): 29186-29193.

- Muller, A., B. Homey, H. Soto, N. Ge, D. Catron, M. E. Buchanan, T. McClanahan, E. Murphy, W. Yuan, S. N. Wagner, J. L. Barrera, A. Mohar, E. Verastegui and A. Zlotnik** (2001). "Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis." *Nature* 410(6824): 50-56.
- Muller, C. A., J. Markovic-Lipkovski, T. Klatt, J. Gamper, G. Schwarz, H. Beck, M. Deeg, H. Kalbacher, S. Widmann, J. T. Wessels, V. Becker, G. A. Muller and T. Flad** (2002). "Human alpha-defensins HNP-1, -2, and -3 in renal cell carcinoma: influences on tumor cell proliferation." *Am J Pathol* 160(4): 1311-1324.
- Mylona, E., A. Nomikos, C. Magkou, M. Kamberou, I. Papassideri, A. Keramopoulos and L. Nakopoulou** (2007). "The clinicopathological and prognostic significance of membrane type 1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) and MMP-9 according to their localization in invasive breast carcinoma." *Histopathology* 50(3): 338-347.
- Nacken, W., J. Roth, C. Sorg and C. Kerkhoff** (2003). "S100A9/S100A8: Myeloid representatives of the S100 protein family as prominent players in innate immunity." *Microsc Res Tech* 60(6): 569-580.
- Nagaraja, G. M., M. Othman, B. P. Fox, R. Alsaber, C. M. Pellegrino, Y. Zeng, R. Khanna, P. Tamburini, A. Swaroop and R. P. Kandpal** (2006). "Gene expression signatures and biomarkers of noninvasive and invasive breast cancer cells: comprehensive profiles by representational difference analysis, microarrays and proteomics." *Oncogene* 25(16): 2328-2338.
- Nakanishi, T., I. Ohtsu, M. Furuta, E. Ando and O. Nishimura** (2005). "Direct MS/MS analysis of proteins blotted on membranes by a matrix-assisted laser desorption/ionization-quadrupole ion trap-time-of-flight tandem mass spectrometer." *J Proteome Res* 4(3): 743-747.
- Nakanishi, Y., A. Ochiai, S. Akimoto, H. Kato, H. Watanabe, Y. Tachimori, S. Yamamoto and S. Hirohashi** (1997). "Expression of E-cadherin, alpha-catenin, beta-catenin and plakoglobin in esophageal carcinomas and its prognostic significance: immunohistochemical analysis of 96 lesions." *Oncology* 54(2): 158-165.
- Nakao, H., M. Watanabe and M. Maki** (1994). "A new function of calphobindin I (annexin V). Promotion of both migration and urokinase-type plasminogen activator activity of normal human keratinocytes." *Eur J Biochem* 223(3): 901-908.
- Navenot, J. M., Z. Wang, M. Chopin, N. Fujii and S. C. Peiper** (2005). "Kisspeptin-10-induced signaling of GPR54 negatively regulates chemotactic responses mediated by CXCR4: a potential mechanism for the metastasis suppressor activity of kisspeptins." *Cancer Res* 65(22): 10450-10456.
- Nemes, P. and A. Vertes** (2010). "Laser ablation electrospray ionization for atmospheric pressure molecular imaging mass spectrometry." *Methods Mol Biol* 656: 159-171.
- Nemeth J, A. P., Hess J** (2009). "Dual role of S100A8 and S100A9 in inflammation-associated cancer. ." *Antiinflamm Antiallergy Agents Med Chem*: 329-336.
- Nicolson, G. L.** (1991). "Gene expression, cellular diversification and tumor progression to the metastatic phenotype." *Bioessays* 13(7): 337-342.
- Nishikawa, T., I. S. Lee, N. Shiraishi, T. Ishikawa, Y. Ohta and M. Nishikimi** (1997). "Identification of S100b protein as copper-binding protein and its suppression of copper-induced cell damage." *J Biol Chem* 272(37): 23037-23041.
- Northern, T. R., O. Yanes, M. T. Northern, D. Marrinucci, W. Uritboonthai, J. Apon, S. L. Golledge, A. Nordstrom and G. Siuzdak** (2007). "Clathrate nanostructures for mass spectrometry." *Nature* 449(7165): 1033-1036.
- Nukui, T., R. Ehama, M. Sakaguchi, H. Sonogawa, C. Katagiri, T. Hibino and N. H. Huh** (2008). "S100A8/A9, a key mediator for positive feedback growth stimulation of normal human keratinocytes." *J Cell Biochem* 104(2): 453-464.
- O'Connell, P. A., P. A. Madureira, J. N. Berman, R. S. Liwski and D. M. Waisman** (2011). "Regulation of S100A10 by the PML-RAR-alpha oncoprotein." *Blood* 117(15): 4095-4105.
- Ochiai, A., S. Akimoto, Y. Shimoyama, A. Nagafuchi, S. Tsukita and S. Hirohashi** (1994). "Frequent loss of alpha catenin expression in scirrhous carcinomas with scattered cell growth." *Jpn J Cancer Res* 85(3): 266-273.
- Oda, T., Y. Kanai, T. Oyama, K. Yoshiura, Y. Shimoyama, W. Birchmeier, T. Sugimura and S. Hirohashi** (1994). "E-cadherin gene mutations in human gastric carcinoma cell lines." *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(5): 1858-1862.
- Odink, K., N. Cerletti, J. Bruggen, R. G. Clerc, L. Tarcsay, G. Zwadlo, G. Gerhards, R. Schlegel and C. Sorg** (1987). "Two calcium-binding proteins in infiltrate macrophages of rheumatoid arthritis." *Nature* 330(6143): 80-82.

- Ogawa, M., K. Ikeuchi, M. Watanabe, K. Etoh, T. Kobayashi, Y. Takao, S. Anazawa and Y. Yamazaki** (2005). "Expression of matrix metalloproteinase 7, laminin and type IV collagen-associated liver metastasis in human colorectal cancer: immunohistochemical approach." *Hepatogastroenterology* 52(63): 875-880.
- Onder, T. T., P. B. Gupta, S. A. Mani, J. Yang, E. S. Lander and R. A. Weinberg** (2008). "Loss of E-cadherin promotes metastasis via multiple downstream transcriptional pathways." *Cancer Res* 68(10): 3645-3654.
- Ott, H. W., H. Lindner, B. Sarg, E. Mueller-Holzner, B. Abendstein, A. Bergant, S. Fessler, P. Schwaerzler, A. Zeimet, C. Marth and K. Illmensee** (2003). "Calgranulins in cystic fluid and serum from patients with ovarian carcinomas." *Cancer Res* 63(21): 7507-7514.
- Palmer-Toy, D. E., D. A. Sarracino, D. Sgroi, R. LeVangie and P. E. Leopold** (2000). "Direct acquisition of matrix-assisted laser Desorption/Ionization time-of-flight mass spectra from laser capture microdissected tissues." *Clin Chem* 46(9): 1513-1516.
- Palmer, D. G., N. Hogg, C. A. Allen, J. Highton and P. A. Hessian** (1987). "A mononuclear phagocyte subset associated with cell necrosis in rheumatoid nodules: identification with monoclonal antibody 5.5." *Clin Immunol Immunopathol* 45(1): 17-28.
- Paradis, V., F. Degos, D. Dargere, N. Pham, J. Belghiti, C. Degott, J. L. Janeau, A. Bezeaud, D. Delforge, M. Cubizolles, I. Laurendeau and P. Bedossa** (2005). "Identification of a new marker of hepatocellular carcinoma by serum protein profiling of patients with chronic liver diseases." *Hepatology* 41(1): 40-47.
- Pei, D.** (2005). "Matrix metalloproteinases target protease-activated receptors on the tumor cell surface." *Cancer Cell* 7(3): 207-208.
- Perl, A. K., P. Wilgenbus, U. Dahl, H. Semb and G. Christofori** (1998). "A causal role for E-cadherin in the transition from adenoma to carcinoma." *Nature* 392(6672): 190-193.
- Petrella, B. L., D. A. Armstrong and M. P. Vincenti** (2012). "Interleukin-1 beta and transforming growth factor-beta 3 cooperate to activate matrix metalloproteinase expression and invasiveness in A549 lung adenocarcinoma cells." *Cancer Lett* 325(2): 220-226.
- Pietropaolo, R. L. and T. Compton** (1997). "Direct interaction between human cytomegalovirus glycoprotein B and cellular annexin II." *J Virol* 71(12): 9803-9807.
- Pietzsch, J. and S. Hoppmann** (2009). "Human S100A12: a novel key player in inflammation?" *Amino Acids* 36(3): 381-389.
- Pille, J. Y., C. Denoyelle, J. Varet, J. R. Bertrand, J. Soria, P. Opolon, H. Lu, L. L. Pritchard, J. P. Vannier, C. Malvy, C. Soria and H. Li** (2005). "Anti-RhoA and anti-RhoC siRNAs inhibit the proliferation and invasiveness of MDA-MB-231 breast cancer cells in vitro and in vivo." *Mol Ther* 11(2): 267-274.
- Pol, J., M. Strohm, V. Havlicek and M. Volny** (2010). "Molecular mass spectrometry imaging in biomedical and life science research." *Histochem Cell Biol* 134(5): 423-443.
- Pol, J., V. Vidova, T. Hyotylainen, M. Volny, P. Novak, M. Strohm, R. Kostianen, V. Havlicek, S. K. Wiedmer and J. M. Holopainen** (2011). "Spatial distribution of glycerophospholipids in the ocular lens." *PLoS One* 6(4): e19441.
- Pollard, T. D., L. Blanchoin and R. D. Mullins** (2000). "Molecular mechanisms controlling actin filament dynamics in nonmuscle cells." *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 29: 545-576.
- Polyak, K. and R. A. Weinberg** (2009). "Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits." *Nat Rev Cancer* 9(4): 265-273.
- Prideaux, B., D. Staab and M. Stoeckli** (2010). "Applications of MALDI-MSI to pharmaceutical research." *Methods Mol Biol* 656: 405-413.
- R., K.** (2009). "A bipolar rate equation model of MALDI primary and secondary ionization processes, with application to positive/negative analyte ion ratios and suppression effects." *Int J Mass Spectrom* 285(3): 105-113.
- Rafii, S. and D. Lyden** (2006). "S100 chemokines mediate bookmarking of premetastatic niches." *Nat Cell Biol* 8(12): 1321-1323.
- Rammes, A., J. Roth, M. Goebeler, M. Klempt, M. Hartmann and C. Sorg** (1997). "Myeloid-related protein (MRP) 8 and MRP14, calcium-binding proteins of the S100 family, are secreted by activated monocytes via a novel, tubulin-dependent pathway." *J Biol Chem* 272(14): 9496-9502.
- Rangan, S. R.** (1972). "A new human cell line (FaDu) from a hypopharyngeal carcinoma." *Cancer* 29(1): 117-121.

- Rasbridge, S. A., C. E. Gillett, S. A. Sampson, F. S. Walsh and R. R. Millis** (1993). "Epithelial (E-) and placental (P-) cadherin cell adhesion molecule expression in breast carcinoma." *J Pathol* 169(2): 245-250.
- Rausser, S., C. Marquardt, B. Balluff, S. O. Deininger, C. Albers, E. Belau, R. Hartmer, D. Suckau, K. Specht, M. P. Ebert, M. Schmitt, M. Aubele, H. Hofler and A. Walch** (2010). "Classification of HER2 receptor status in breast cancer tissues by MALDI imaging mass spectrometry." *J Proteome Res* 9(4): 1854-1863.
- Raynal, P. and H. B. Pollard** (1994). "Annexins: the problem of assessing the biological role for a gene family of multifunctional calcium- and phospholipid-binding proteins." *Biochim Biophys Acta* 1197(1): 63-93.
- Rehman, I., A. R. Azzouzi, S. S. Cross, J. C. Deloulme, J. W. Catto, N. Wylde, S. Larre, J. Champigneulle and F. C. Hamdy** (2004). "Dysregulated expression of S100A11 (calgizzarin) in prostate cancer and precursor lesions." *Hum Pathol* 35(11): 1385-1391.
- Rescher, U. and V. Gerke** (2004). "Annexins--unique membrane binding proteins with diverse functions." *J Cell Sci* 117(Pt 13): 2631-2639.
- Rety, S., D. Osterloh, J. P. Arie, S. Tabaries, J. Seeman, F. Russo-Marie, V. Gerke and A. Lewit-Bentley** (2000). "Structural basis of the Ca(2+)-dependent association between S100C (S100A11) and its target, the N-terminal part of annexin I." *Structure* 8(2): 175-184.
- Rety, S., J. Sopkova, M. Renouard, D. Osterloh, V. Gerke, S. Tabaries, F. Russo-Marie and A. Lewit-Bentley** (1999). "The crystal structure of a complex of p11 with the annexin II N-terminal peptide." *Nat Struct Biol* 6(1): 89-95.
- Reutelingsperger, C. P., G. Hornstra and H. C. Hemker** (1985). "Isolation and partial purification of a novel anticoagulant from arteries of human umbilical cord." *Eur J Biochem* 151(3): 625-629.
- Reutelingsperger, C. P. and W. L. van Heerde** (1997). "Annexin V, the regulator of phosphatidylserine-catalyzed inflammation and coagulation during apoptosis." *Cell Mol Life Sci* 53(6): 527-532.
- Riddick, A. C., C. J. Shukla, C. J. Pennington, R. Bass, R. K. Nuttall, A. Hogan, K. K. Sethia, V. Ellis, A. T. Collins, N. J. Maitland, R. Y. Ball and D. R. Edwards** (2005). "Identification of degradome components associated with prostate cancer progression by expression analysis of human prostatic tissues." *Br J Cancer* 92(12): 2171-2180.
- Riuzzi, F., G. Sorci, S. Beccafico and R. Donato** (2012). "S100B engages RAGE or bFGF/FGFR1 in myoblasts depending on its own concentration and myoblast density. Implications for muscle regeneration." *PLoS One* 7(1): e28700.
- Riuzzi, F., G. Sorci and R. Donato** (2011). "S100B protein regulates myoblast proliferation and differentiation by activating FGFR1 in a bFGF-dependent manner." *J Cell Sci* 124(Pt 14): 2389-2400.
- Roth, J., T. Vogl, C. Sorg and C. Sunderkotter** (2003). "Phagocyte-specific S100 proteins: a novel group of proinflammatory molecules." *Trends Immunol* 24(4): 155-158.
- Rothhut, B.** (1997). "Participation of annexins in protein phosphorylation." *Cell Mol Life Sci* 53(6): 522-526.
- Russo-Marie, F.** (1999). "Annexin V and phospholipid metabolism." *Clin Chem Lab Med* 37(3): 287-291.
- Rutten FJM, B. D., Henderson J, Roe MJ** (2009). "The application of time-of-flight secondary ion mass spectrometry (TOF-SIMS) to the characterization of opaque ancient glasses." *Archaeometry* 51: 966.
- Sagot, I., F. Regnouf, J. P. Henry and L. A. Pradel** (1997). "Translocation of cytosolic annexin 2 to a Triton-insoluble membrane subdomain upon nicotine stimulation of chromaffin cultured cells." *FEBS Lett* 410(2-3): 229-234.
- Sakaguchi, M., M. Miyazaki, H. Sonegawa, M. Kashiwagi, M. Ohba, T. Kuroki, M. Namba and N. H. Huh** (2004). "PKC α mediates TGF β -induced growth inhibition of human keratinocytes via phosphorylation of S100C/A11." *J Cell Biol* 164(7): 979-984.
- Salama, I., P. S. Malone, F. Mihaimeed and J. L. Jones** (2008). "A review of the S100 proteins in cancer." *Eur J Surg Oncol* 34(4): 357-364.
- Saleem, M., M. H. Kweon, J. J. Johnson, V. M. Adhami, I. Elcheva, N. Khan, B. Bin Hafeez, K. M. Bhat, S. Sarfaraz, S. Reagan-Shaw, V. S. Spiegelman, V. Setaluri and H. Mukhtar** (2006). "S100A4 accelerates tumorigenesis and invasion of human prostate cancer through the transcriptional regulation of matrix metalloproteinase 9." *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(40): 14825-14830.
- Sampson, J. S., A. M. Hawkrige and D. C. Muddiman** (2006). "Generation and detection of multiply-charged peptides and proteins by matrix-assisted laser desorption electrospray ionization (MALDESI) Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry." *J Am Soc Mass Spectrom* 17(12): 1712-1716.

- Santamaria-Kiesel, L., A. C. Rintala-Dempsey and G. S. Shaw** (2006). "Calcium-dependent and -independent interactions of the S100 protein family." *Biochem J* 396(2): 201-214.
- Schafer, B. W., J. M. Fritschy, P. Murmann, H. Troxler, I. Durussel, C. W. Heizmann and J. A. Cox** (2000). "Brain S100A5 is a novel calcium-, zinc-, and copper ion-binding protein of the EF-hand superfamily." *J Biol Chem* 275(39): 30623-30630.
- Schafer, B. W. and C. W. Heizmann** (1996). "The S100 family of EF-hand calcium-binding proteins: functions and pathology." *Trends Biochem Sci* 21(4): 134-140.
- Schafer, B. W., R. Wicki, D. Engelkamp, M. G. Mattei and C. W. Heizmann** (1995). "Isolation of a YAC clone covering a cluster of nine S100 genes on human chromosome 1q21: rationale for a new nomenclature of the S100 calcium-binding protein family." *Genomics* 25(3): 638-643.
- Schlaepfer, D. D. and H. T. Haigler** (1987). "Characterization of Ca²⁺-dependent phospholipid binding and phosphorylation of lipocortin I." *J Biol Chem* 262(14): 6931-6937.
- Schmidt, M., R. Gillitzer, A. Toksoy, E. B. Brocker, U. R. Rapp, R. Paus, J. Roth, S. Ludwig and M. Goebeler** (2001). "Selective expression of calcium-binding proteins S100a8 and S100a9 at distinct sites of hair follicles." *J Invest Dermatol* 117(3): 748-750.
- Schürenberg, M., Luebbert, C. Deininger, S.-O., Ketterlinus, R., Suckau, D.** (2007). "MALDI tissue imaging: mass spectrometric localization of biomarkers in tissue slices." *Nature Methods* (Application Note) 4.
- Schürenberg, M., Luebbert, C., Deininger, SO., Müller, R., Suckau, D.** (2006). "A New Device for Automated MALDI Imaging High Performance Sample Preparation." *Bruker Daltonics Technical Note* TN-18.
- Schwamborn, K. and R. M. Caprioli** (2010). "Molecular imaging by mass spectrometry--looking beyond classical histology." *Nat Rev Cancer* 10(9): 639-646.
- Schwamborn, K., R. C. Krieg, M. Reska, G. Jakse, R. Knuechel and A. Wellmann** (2007). "Identifying prostate carcinoma by MALDI-Imaging." *Int J Mol Med* 20(2): 155-159.
- Schwartz, S. A., M. L. Reyzer and R. M. Caprioli** (2003). "Direct tissue analysis using matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry: practical aspects of sample preparation." *J Mass Spectrom* 38(7): 699-708.
- Seeley, E. H. and R. M. Caprioli** (2008). "Molecular imaging of proteins in tissues by mass spectrometry." *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(47): 18126-18131.
- Seeley, E. H. and R. M. Caprioli** (2011). "MALDI imaging mass spectrometry of human tissue: method challenges and clinical perspectives." *Trends Biotechnol* 29(3): 136-143.
- Semmes, O. J., Z. Feng, B. L. Adam, L. L. Banez, W. L. Bigbee, D. Campos, L. H. Cazares, D. W. Chan, W. E. Grizzle, E. Izbiccka, J. Kagan, G. Malik, D. McLerran, J. W. Moul, A. Partin, P. Prasanna, J. Rosenzweig, L. J. Sokoll, S. Srivastava, S. Srivastava, I. Thompson, M. J. Welsh, N. White, M. Winget, Y. Yasui, Z. Zhang and L. Zhu** (2005). "Evaluation of serum protein profiling by surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry for the detection of prostate cancer: I. Assessment of platform reproducibility." *Clin Chem* 51(1): 102-112.
- Seth, A., R. Kitching, G. Landberg, J. Xu, J. Zubovits and A. M. Burger** (2003). "Gene expression profiling of ductal carcinomas in situ and invasive breast tumors." *Anticancer Res* 23(3A): 2043-2051.
- Shanta, S. R., L. H. Zhou, Y. S. Park, Y. H. Kim, Y. Kim and K. P. Kim** (2011). "Binary matrix for MALDI imaging mass spectrometry of phospholipids in both ion modes." *Anal Chem* 83(4): 1252-1259.
- Shaw, L. M., I. Rabinovitz, H. H. Wang, A. Toker and A. M. Mercurio** (1997). "Activation of phosphoinositide 3-OH kinase by the alpha6beta4 integrin promotes carcinoma invasion." *Cell* 91(7): 949-960.
- Shen, J., M. D. Person, J. Zhu, J. L. Abbruzzese and D. Li** (2004). "Protein expression profiles in pancreatic adenocarcinoma compared with normal pancreatic tissue and tissue affected by pancreatitis as detected by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry." *Cancer Res* 64(24): 9018-9026.
- Shi, W., N. Heisterkamp, J. Groffen, J. Zhao, D. Warburton and V. Kaartinen** (1999). "TGF-beta3-null mutation does not abrogate fetal lung maturation in vivo by glucocorticoids." *Am J Physiol* 277(6 Pt 1): L1205-1213.
- Shimma, S., Y. Sugiura, T. Hayasaka, Y. Hoshikawa, T. Noda and M. Setou** (2007). "MALDI-based imaging mass spectrometry revealed abnormal distribution of phospholipids in colon cancer liver metastasis." *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 855(1): 98-103.
- Shimoyama, Y., M. Gotoh, T. Terasaki, M. Kitajima and S. Hirohashi** (1995). "Isolation and sequence analysis of human cadherin-6 complementary DNA for the full coding sequence and its expression in human carcinoma cells." *Cancer Res* 55(10): 2206-2211.

- Shimoyama, Y. and S. Hirohashi** (1991). "Expression of E- and P-cadherin in gastric carcinomas." *Cancer Res* 51(8): 2185-2192.
- Shrestha, P., Y. Muramatsu, W. Kudeken, M. Mori, Y. Takai, E. C. Ilg, B. W. Schafer and C. W. Heizmann** (1998). "Localization of Ca(2+)-binding S100 proteins in epithelial tumours of the skin." *Virchows Arch* 432(1): 53-59.
- Shrivastava, K., T. Hayasaka, N. Goto-Inoue, Y. Sugiura, N. Zaima and M. Setou** (2010). "Ionic Matrix for Enhanced MALDI Imaging Mass Spectrometry for Identification of Phospholipids in Mouse Liver and Cerebellum Tissue Sections." *Anal Chem*.
- Siever, D. A. and H. P. Erickson** (1997). "Extracellular annexin II." *Int J Biochem Cell Biol* 29(11): 1219-1223.
- Signor, L., E. Varesio, R. F. Staack, V. Starke, W. F. Richter and G. Hopfgartner** (2007). "Analysis of erlotinib and its metabolites in rat tissue sections by MALDI quadrupole time-of-flight mass spectrometry." *J Mass Spectrom* 42(7): 900-909.
- Simpson, K. J., A. S. Dugan and A. M. Mercurio** (2004). "Functional analysis of the contribution of RhoA and RhoC GTPases to invasive breast carcinoma." *Cancer Res* 64(23): 8694-8701.
- Sinha, P., C. Okoro, D. Foell, H. H. Freeze, S. Ostrand-Rosenberg and G. Srikrishna** (2008). "Proinflammatory S100 proteins regulate the accumulation of myeloid-derived suppressor cells." *J Immunol* 181(7): 4666-4675.
- Smith, P. D. and S. E. Moss** (1994). "Structural evolution of the annexin supergene family." *Trends Genet* 10(7): 241-246.
- Soni, S., M. Mathur, N. K. Shukla, S. V. Deo and R. Ralhan** (2003). "Stromelysin-3 expression is an early event in human oral tumorigenesis." *Int J Cancer* 107(2): 309-316.
- Srikrishna, G.** (2012). "S100A8 and S100A9: new insights into their roles in malignancy." *J Innate Immun* 4(1): 31-40.
- Stetler-Stevenson, W. G., L. A. Liotta and D. E. Kleiner, Jr.** (1993). "Extracellular matrix 6: role of matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis." *FASEB J* 7(15): 1434-1441.
- Stoeckli M, S. D., Schweitzer A** (2007). "Compound and metabolite distribution measured by MALDI mass spectrometric imaging in whole-body tissue sections." *Int J Mass Spectrom* 260(2-3): 195-202.
- Striz, I. and I. Trebichavsky** (2004). "Calprotectin - a pleiotropic molecule in acute and chronic inflammation." *Physiol Res* 53(3): 245-253.
- Stulik, J., K. Koupilova, J. Osterreicher, J. Knizek, A. Macela, J. Bures, P. Jandik, F. Langr, K. Dedic and P. R. Jungblut** (1999). "Protein abundance alterations in matched sets of macroscopically normal colon mucosa and colorectal carcinoma." *Electrophoresis* 20(18): 3638-3646.
- Stulik, J., J. Osterreicher, K. Koupilova, Knizek, A. Macela, J. Bures, P. Jandik, F. Langr, K. Dedic and P. R. Jungblut** (1999). "The analysis of S100A9 and S100A8 expression in matched sets of macroscopically normal colon mucosa and colorectal carcinoma: the S100A9 and S100A8 positive cells underlie and invade tumor mass." *Electrophoresis* 20(4-5): 1047-1054.
- Sun, Y. X., A. Schneider, Y. Jung, J. Wang, J. Dai, J. Wang, K. Cook, N. I. Osman, A. J. Koh-Paige, H. Shim, K. J. Pienta, E. T. Keller, L. K. McCauley and R. S. Taichman** (2005). "Skeletal localization and neutralization of the SDF-1(CXCL12)/CXCR4 axis blocks prostate cancer metastasis and growth in osseous sites in vivo." *J Bone Miner Res* 20(2): 318-329.
- Sun, Y. X., J. Wang, C. E. Shelburne, D. E. Lopatin, A. M. Chinnaiyan, M. A. Rubin, K. J. Pienta and R. S. Taichman** (2003). "Expression of CXCR4 and CXCL12 (SDF-1) in human prostate cancers (PCa) in vivo." *J Cell Biochem* 89(3): 462-473.
- Suryono, J. Kido, N. Hayashi, M. Kataoka, Y. Shinohara and T. Nagata** (2006). "Norepinephrine stimulates calprotectin expression in human monocytic cells." *J Periodontal Res* 41(3): 159-164.
- Swairjo, M. A., N. O. Concha, M. A. Kaetzel, J. R. Dedman and B. A. Seaton** (1995). "Ca(2+)-bridging mechanism and phospholipid head group recognition in the membrane-binding protein annexin V." *Nat Struct Biol* 2(11): 968-974.
- Tait, J. F. and D. Gibson** (1992). "Phospholipid binding of annexin V: effects of calcium and membrane phosphatidylserine content." *Arch Biochem Biophys* 298(1): 187-191.
- Tait, J. F., D. Gibson and K. Fujikawa** (1989). "Phospholipid binding properties of human placental anticoagulant protein-I, a member of the lipocortin family." *J Biol Chem* 264(14): 7944-7949.

- Takats, Z., J. M. Wiseman, B. Gologan and R. G. Cooks** (2004). "Mass spectrometry sampling under ambient conditions with desorption electrospray ionization." *Science* 306(5695): 471-473.
- Tang, H. W., W. Lu, C. M. Che and K. M. Ng** (2010). "Gold nanoparticles and imaging mass spectrometry: double imaging of latent fingerprints." *Anal Chem* 82(5): 1589-1593.
- Terasaki, F., M. Fujita, H. Shimomura, B. Tsukada, K. Otsuka, K. Otsuka, T. Katashima, M. Ikemoto and Y. Kitauro** (2007). "Enhanced expression of myeloid-related protein complex (MRP8/14) in macrophages and multinucleated giant cells in granulomas of patients with active cardiac sarcoidosis." *Circ J* 71(10): 1545-1550.
- Thiery, J. P., H. Acloque, R. Y. Huang and M. A. Nieto** (2009). "Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease." *Cell* 139(5): 871-890.
- Thiery, J. P. and J. P. Sleeman** (2006). "Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions." *Nat Rev Mol Cell Biol* 7(2): 131-142.
- Tian, M., J. R. Neil and W. P. Schiemann** (2011). "Transforming growth factor-beta and the hallmarks of cancer." *Cell Signal* 23(6): 951-962.
- Tiwari, N., A. Gheldof, M. Tatari and G. Christofori** (2012). "EMT as the ultimate survival mechanism of cancer cells." *Semin Cancer Biol* 22(3): 194-207.
- Todd, P. J., T. G. Schaaff, P. Chaurand and R. M. Caprioli** (2001). "Organic ion imaging of biological tissue with secondary ion mass spectrometry and matrix-assisted laser desorption/ionization." *J Mass Spectrom* 36(4): 355-369.
- Towbin, H., T. Staehelin and J. Gordon** (1979). "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications." *Proc Natl Acad Sci U S A* 76(9): 4350-4354.
- Trim, P. J., M. C. Djidja, S. J. Atkinson, K. Oakes, L. M. Cole, D. M. Anderson, P. J. Hart, S. Francese and M. R. Clench** (2010). "Introduction of a 20 kHz Nd:YVO4 laser into a hybrid quadrupole time-of-flight mass spectrometer for MALDI-MS imaging." *Anal Bioanal Chem* 397(8): 3409-3419.
- Trotter, P. J., M. A. Orchard and J. H. Walker** (1997). "Relocation of annexin V to platelet membranes is a phosphorylation-dependent process." *Biochem J* 328 (Pt 2): 447-452.
- Tu, T. and M. L. Gross** (2009). "Miniaturizing sample spots for matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry." *Trends Analyt Chem* 28(7): 833-841.
- Tu, T., A. D. Sauter, Jr., A. D. Sauter, 3rd and M. L. Gross** (2008). "Improving the signal intensity and sensitivity of MALDI mass spectrometry by using nanoliter spots deposited by induction-based fluidics." *J Am Soc Mass Spectrom* 19(8): 1086-1090.
- Tubaro, C., C. Arcuri, I. Giambanco and R. Donato** (2011). "S100B in myoblasts regulates the transition from activation to quiescence and from quiescence to activation and reduces apoptosis." *Biochim Biophys Acta* 1813(5): 1092-1104.
- Tucker, K. R., L. A. Serebryanny, T. A. Zimmerman, S. S. Rubakhin and J. V. Sweedler** (2011). "The modified-bead stretched sample method: development and application to MALDI-MS imaging of protein localization in the spinal cord." *Chem Sci* 2(4): 785-795.
- Tuschl, T. and A. Borkhardt** (2002). "Small interfering RNAs: a revolutionary tool for the analysis of gene function and gene therapy." *Mol Interv* 2(3): 158-167.
- van Dieck, J., D. P. Teufel, A. M. Jaulent, M. R. Fernandez-Fernandez, T. J. Rutherford, A. Wyslouch-Cieszyńska and A. R. Fersht** (2009). "Posttranslational modifications affect the interaction of S100 proteins with tumor suppressor p53." *J Mol Biol* 394(5): 922-930.
- Van Eldik, L. J. and W. S. Griffin** (1994). "S100 beta expression in Alzheimer's disease: relation to neuropathology in brain regions." *Biochim Biophys Acta* 1223(3): 398-403.
- Van Ginkel, P. R., R. L. Gee, T. M. Walker, D. N. Hu, C. W. Heizmann and A. S. Polans** (1998). "The identification and differential expression of calcium-binding proteins associated with ocular melanoma." *Biochim Biophys Acta* 1448(2): 290-297.
- van Heerde, W. L., P. G. de Groot and C. P. Reutelingsperger** (1995). "The complexity of the phospholipid binding protein Annexin V." *Thromb Haemost* 73(2): 172-179.
- van Heerde WL, L. P., Schoormans S, de Groot PG, Reutelingsperger C, Vroom TM** (2004). "Localization of Annexin A5 in Human Tissues." *Landes Bioscience*: 37-43.

- Vazquez-Ortiz, G., P. Pina-Sanchez, K. Vazquez, A. Duenas, L. Taja, P. Mendoza, J. A. Garcia and M. Salcedo** (2005). "Overexpression of cathepsin F, matrix metalloproteinases 11 and 12 in cervical cancer." *BMC Cancer* 5: 68.
- Vogl, T., S. Ludwig, M. Goebeler, A. Strey, I. S. Thorey, R. Reichelt, D. Foell, V. Gerke, M. P. Manitz, W. Nacken, S. Werner, C. Sorg and J. Roth** (2004). "MRP8 and MRP14 control microtubule reorganization during transendothelial migration of phagocytes." *Blood* 104(13): 4260-4268.
- Vogl, T., K. Tenbrock, S. Ludwig, N. Leukert, C. Ehrhardt, M. A. van Zoelen, W. Nacken, D. Foell, T. van der Poll, C. Sorg and J. Roth** (2007). "Mrp8 and Mrp14 are endogenous activators of Toll-like receptor 4, promoting lethal, endotoxin-induced shock." *Nat Med* 13(9): 1042-1049.
- von Eggeling, F., H. Davies, L. Lomas, W. Fiedler, K. Junker, U. Claussen and G. Ernst** (2000). "Tissue-specific microdissection coupled with ProteinChip array technologies: applications in cancer research." *Biotechniques* 29(5): 1066-1070.
- von Eggeling, F., K. Junker, W. Fiedler, V. Wollscheid, M. Durst, U. Claussen and G. Ernst** (2001). "Mass spectrometry meets chip technology: a new proteomic tool in cancer research?" *Electrophoresis* 22(14): 2898-2902.
- von Eggeling, F., C. Melle and G. Ernst** (2007). "Microdissecting the proteome." *Proteomics* 7(16): 2729-2737.
- Wang, J., R. Loberg and R. S. Taichman** (2006). "The pivotal role of CXCL12 (SDF-1)/CXCR4 axis in bone metastasis." *Cancer Metastasis Rev* 25(4): 573-587.
- Wang, W., J. Xu and T. Kirsch** (2003). "Annexin-mediated Ca²⁺ influx regulates growth plate chondrocyte maturation and apoptosis." *J Biol Chem* 278(6): 3762-3769.
- Wang, W., L. Y. Yang, G. W. Huang, W. Q. Lu, Z. L. Yang, J. Q. Yang and H. L. Liu** (2004). "Genomic analysis reveals RhoC as a potential marker in hepatocellular carcinoma with poor prognosis." *Br J Cancer* 90(12): 2349-2355.
- Ward, D. G., N. Suggett, Y. Cheng, W. Wei, H. Johnson, L. J. Billingham, T. Ismail, M. J. Wakelam, P. J. Johnson and A. Martin** (2006). "Identification of serum biomarkers for colon cancer by proteomic analysis." *Br J Cancer* 94(12): 1898-1905.
- Watanabe, M., S. Kondo, K. Mizuno, W. Yano, H. Nakao, Y. Hattori, K. Kimura and T. Nishida** (2006). "Promotion of corneal epithelial wound healing in vitro and in vivo by annexin A5." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 47(5): 1862-1868.
- Watrous, J., N. Hendricks, M. Meehan and P. C. Dorrestein** (2010). "Capturing bacterial metabolic exchange using thin film desorption electrospray ionization-imaging mass spectrometry." *Anal Chem* 82(5): 1598-1600.
- Watrous, J. D., T. Alexandrov and P. C. Dorrestein** (2011). "The evolving field of imaging mass spectrometry and its impact on future biological research." *J Mass Spectrom* 46(2): 209-222.
- Wehder, L.** (2008). "Die Rolle von Annexin V während der Tumordinvasion." Diplomarbeit im Fachbereich Biologie, FSU Jena.
- Wehder, L., S. Arndt, U. Murzik, A. K. Bosserhoff, R. Kob, F. von Eggeling and C. Melle** (2009). "Annexin A5 is involved in migration and invasion of oral carcinoma." *Cell Cycle* 8(10): 1552-1558.
- Wehder, L., G. Ernst, A. C. Creelius, O. Guntinas-Lichius, C. Melle, U. S. Schubert and F. von Eggeling** (2010). "Depicting the spatial distribution of proteins in human tumor tissue combining SELDI and MALDI imaging and immunohistochemistry." *J Histochem Cytochem* 58(10): 929-937.
- Wheelock, M. J. and K. R. Johnson** (2003). "Cadherins as modulators of cellular phenotype." *Annu Rev Cell Dev Biol* 19: 207-235.
- Wilkinson, M. M., A. Busuttil, C. Hayward, D. J. Brock, J. R. Dorin and V. Van Heyningen** (1988). "Expression pattern of two related cystic fibrosis-associated calcium-binding proteins in normal and abnormal tissues." *J Cell Sci* 91 (Pt 2): 221-230.
- Willems, S. M., A. van Remoortere, R. van Zeijl, A. M. Deelder, L. A. McDonnell and P. C. Hogendoorn** (2010). "Imaging mass spectrometry of myxoid sarcomas identifies proteins and lipids specific to tumour type and grade, and reveals biochemical intratumour heterogeneity." *J Pathol* 222(4): 400-409.
- Wiseman, J. M., D. R. Ifa, Q. Song and R. G. Cooks** (2006). "Tissue imaging at atmospheric pressure using desorption electrospray ionization (DESI) mass spectrometry." *Angew Chem Int Ed Engl* 45(43): 7188-7192.
- Wolf, C. and P. J. Quinn** (2008). "Lipidomics: practical aspects and applications." *Prog Lipid Res* 47(1): 15-36.

- Wu, C. Y., M. S. Wu, E. P. Chiang, Y. J. Chen, C. J. Chen, N. H. Chi, Y. T. Shih, G. H. Chen and J. T. Lin** (2007). "Plasma matrix metalloproteinase-9 level is better than serum matrix metalloproteinase-9 level to predict gastric cancer evolution." *Clin Cancer Res* 13(7): 2054-2060.
- Wu, T., C. W. Angus, X. L. Yao, C. Logun and J. H. Shelhamer** (1997). "P11, a unique member of the S100 family of calcium-binding proteins, interacts with and inhibits the activity of the 85-kDa cytosolic phospholipase A2." *J Biol Chem* 272(27): 17145-17153.
- Wu, Z., Z. Wu, J. Li, X. Yang, Y. Wang, Y. Yu, J. Ye, C. Xu, W. Qin and Z. Zhang** (2012). "MCAM is a novel metastasis marker and regulates spreading, apoptosis and invasion of ovarian cancer cells." *Tumour Biol* 33(5): 1619-1628.
- Xie, S., M. Luca, S. Huang, M. Gutman, R. Reich, J. P. Johnson and M. Bar-Eli** (1997). "Expression of MCAM/MUC18 by human melanoma cells leads to increased tumor growth and metastasis." *Cancer Res* 57(11): 2295-2303.
- Xu, B. J., R. M. Caprioli, M. E. Sanders and R. A. Jensen** (2002). "Direct analysis of laser capture microdissected cells by MALDI mass spectrometry." *J Am Soc Mass Spectrom* 13(11): 1292-1297.
- Yan, W. X., C. Armishaw, J. Goyette, Z. Yang, H. Cai, P. Alewood and C. L. Geczy** (2008). "Mast cell and monocyte recruitment by S100A12 and its hinge domain." *J Biol Chem* 283(19): 13035-13043.
- Yang, J. and R. A. Weinberg** (2008). "Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis." *Dev Cell* 14(6): 818-829.
- Yang, Y. L., Y. Xu, P. Straight and P. C. Dorrestein** (2009). "Translating metabolic exchange with imaging mass spectrometry." *Nat Chem Biol* 5(12): 885-887.
- Yao, H., E. J. Dashner, C. M. van Golen and K. L. van Golen** (2006). "RhoC GTPase is required for PC-3 prostate cancer cell invasion but not motility." *Oncogene* 25(16): 2285-2296.
- Yao, R., A. Lopez-Beltran, G. T. Maclennan, R. Montironi, J. N. Eble and L. Cheng** (2007). "Expression of S100 protein family members in the pathogenesis of bladder tumors." *Anticancer Res* 27(5A): 3051-3058.
- Yap, A. S., W. M. Brieher and B. M. Gumbiner** (1997). "Molecular and functional analysis of cadherin-based adherens junctions." *Annu Rev Cell Dev Biol* 13: 119-146.
- Yokoi, S., K. Yasui, F. Saito-Ohara, K. Koshikawa, T. Iizasa, T. Fujisawa, T. Terasaki, A. Horii, T. Takahashi, S. Hirohashi and J. Inazawa** (2002). "A novel target gene, SKP2, within the 5p13 amplicon that is frequently detected in small cell lung cancers." *Am J Pathol* 161(1): 207-216.
- Yong, H. Y. and A. Moon** (2007). "Roles of calcium-binding proteins, S100A8 and S100A9, in invasive phenotype of human gastric cancer cells." *Arch Pharm Res* 30(1): 75-81.
- Zabouo, G., A. M. Imbert, J. Jacquemier, P. Finetti, T. Moreau, B. Esterni, D. Birnbaum, F. Bertucci and C. Chabannon** (2009). "CD146 expression is associated with a poor prognosis in human breast tumors and with enhanced motility in breast cancer cell lines." *Breast Cancer Res* 11(1): R1.
- Zhang, J., B. Guo, Y. Zhang, J. Cao and T. Chen** (2010). "Silencing of the annexin II gene down-regulates the levels of S100A10, c-Myc, and plasmin and inhibits breast cancer cell proliferation and invasion." *Saudi Med J* 31(4): 374-381.
- Zhang, L., D. K. Fogg and D. M. Waisman** (2004). "RNA interference-mediated silencing of the S100A10 gene attenuates plasmin generation and invasiveness of Colo 222 colorectal cancer cells." *J Biol Chem* 279(3): 2053-2062.
- Zhao, Z., J. Ge, Y. Sun, L. Tian, J. Lu, M. Liu and Y. Zhao** (2012). "Is E-cadherin immunoexpression a prognostic factor for head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC)? A systematic review and meta-analysis." *Oral Oncol* 48(9): 761-767.
- Zheng, H., H. Takahashi, Y. Murai, Z. Cui, K. Nomoto, H. Niwa, K. Tsuneyama and Y. Takano** (2006). "Expressions of MMP-2, MMP-9 and VEGF are closely linked to growth, invasion, metastasis and angiogenesis of gastric carcinoma." *Anticancer Res* 26(5A): 3579-3583.
- Zhi, H., J. Zhang, G. Hu, J. Lu, X. Wang, C. Zhou, M. Wu and Z. Liu** (2003). "The deregulation of arachidonic acid metabolism-related genes in human esophageal squamous cell carcinoma." *Int J Cancer* 106(3): 327-333.
- Zimmer, D. B., E. H. Cornwall, A. Landar and W. Song** (1995). "The S100 protein family: history, function, and expression." *Brain Res Bull* 37(4): 417-429.
- Zimmerman, T. A., E. B. Monroe and J. V. Sweedler** (2008). "Adapting the stretched sample method from tissue profiling to imaging." *Proteomics* 8(18): 3809-3815.

Zimmerman, T. A., S. S. Rubakhin and J. V. Sweedler (2010). "Mass spectrometry imaging using the stretched sample approach." *Methods Mol Biol* 656: 465-479.

Zwadlo, G., J. Bruggen, G. Gerhards, R. Schlegel and C. Sorg (1988). "Two calcium-binding proteins associated with specific stages of myeloid cell differentiation are expressed by subsets of macrophages in inflammatory tissues." *Clin Exp Immunol* 72(3): 510-515.

6.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der Sekundärstruktur der S100-Proteine	9
Abbildung 2: S100-Proteine und ihre Funktionen	10
Abbildung 3: S100A8/A9 fördert die Proliferation verschiedener Krebszelllinien	14
Abbildung 4: Kristallstruktur des humanen Annexin A5:	15
Abbildung 5: Der Weg einer metastatischen Zelle	20
Abbildung 6: Manuelles Pipettieren der Matrix auf Gewebeschnitte	41
Abbildung 7: <i>InkJet printing</i> von DHB, HCCA und FA auf Nierengewebe	42
Abbildung 8: Gesamt-Protein-Spektrum einer Ratten-Niere	43
Abbildung 9: MALDI-IMS Signale einer Ratten-Niere	43
Abbildung 10: Gesamtspektrum eines Kopf-Hals-Tumors nach MALDI-IMS-Messung	44
Abbildung 11: MALDI-IMS-Messung eines Tonsillenkarcinoms	46
Abbildung 12: Ausschnitt eines MALDI-IMS-Spektrums	46
Abbildung 13: Vergleich MALDI-IMS-Analyse und IHC	47
Abbildung 14: MALDI-IMS-Analyse von Kopf-Hals-Tumoren:	48
Abbildung 15: Ungefärbter Gewebeschnitt für die Mikrodissektion	49
Abbildung 16: SELDI-MS-Spektren des nekrotischen sowie des Tumorgewebes	49
Abbildung 17: Immunhistochemische Färbungen von HNP1-3 und S100A8	50
Abbildung 18: Immundepletion von S100A8	51
Abbildung 19: Immuncapturing von S100A8	52
Abbildung 20: Verteilung der S100-Signale innerhalb eines Zungenrandkarzinoms	52
Abbildung 21: Verteilung der S100-Proteine innerhalb eines Tonsillenkarcinoms	53
Abbildung 22: Verteilung der S100-Proteine innerhalb eines Valleculla-Karzinoms	53
Abbildung 23: Immunhistochemie (IHC) für S100A8 (A), S100A9 (B) und S100A11 (C) am Tonsillenkarcinom	53
Abbildung 24: Immunhistochemie für S100A8 (A) und S100A9 (B) am Valleculla-Karzinom	54
Abbildung 25: MALDI-IMS-Analyse einer Kopf-Hals-Tumor-Probe	55
Abbildung 26: Segmentierung einer HNC-Gewebeprobe	55
Abbildung 27: Segmentierung einer HNC-Gewebeprobe	56
Abbildung 28: <i>Segmentation maps</i> des Tumorbereiches	56
Abbildung 29: <i>Segmentation maps</i> eines Tonsillentumors	57
Abbildung 30: <i>Segmentation maps</i> eines Tonsillen Tumors	57
Abbildung 31: MALDI-IMS-Analyse von N2A-Zellen	58
Abbildung 32: Untersuchung verschiedener Zelllinien auf die Expression von S100A8	59
Abbildung 33: pVITRO-S100A8/A9-Transfektion in HaCaT-Keratinocyten	60
Abbildung 34: Stimulation der S100A8/A9 Expression und Sekretion durch CaCl ₂ bei HaCaT- Keratinocyten	60
Abbildung 35: Stimulation der S100A8/A9 Expression und Sekretion durch CaCl ₂ bei FaDu-Zellen	61
Abbildung 36: Lokalisation von S100A8 in fixierten HaCaT-Keratinocyten	62
Abbildung 37: Lokalisation von S100A8 in fixierten FaDu-Zellen	62
Abbildung 38: Migrationstest mittels Scratch-Assay mit FaDu Zellen	63
Abbildung 39: Migrationstest mittels Scratch-Assay	64
Abbildung 40: Bestimmung des Migrationspotentials von S100A8/A9 mittels Boyden-Kammer	65
Abbildung 41: Bestimmung des Invasionspotentials von S100A8/A9 mittels Boyden-Kammer	65
Abbildung 42: S100A8/A9 zeigt eine gesteigerte Proliferationsrate bei FaDu-HNC-Zellen	66

Abbildung 43: S100A8/A9 hat keinen Einfluss auf die Proliferationsrate von HaCaT-Keratinocyten...	67
Abbildung 44: Analyse des Migrations- und Invasionspotentials von Annexin A5	73
Abbildung 45: Transfektionseffizienz auf mRNA-Ebene	74
Abbildung 46: Migrationstest mittels Scratch-Assay	75
Abbildung 47: Effekt der Annexin A5-Depletion auf Metastase-involvierte Gene	77
Abbildung 48: mRNA-Expressionsniveau von <i>RHOC</i> , <i>TIMP3</i> und <i>RB1</i> nach ANX5-Depletion.....	78
Abbildung 49: Eine Annexin A5-Depletion verändert die Expression Metastase-involvierter Gene auch auf Proteineben.....	78

6.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete primäre Antikörper	24
Tabelle 2: Expressionsprofil der Metastase-involvierten Gene nach S100A8/A9-Transfektion bei FaDu-HNC-Zellen	68
Tabelle 3: Genexpressions-Analyse Metastase-involvierter Gene nach S100A8/A9-Transfektion bei HaCaT-Keratinocyten	70
Tabelle 4: Expressionsprofil der Metastase-involvierten Gene nach Annexin A5 Depletion.....	76

6.4 Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
α	Anti
Abb.	Abbildung
ACN	Azetonitril
Ak	Antikörper
ANX5	Annexin A5
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BCIP 5- bzw.	Brom-4-chlor-3-indolylphosphat-Dinatriumsalz beziehungsweise
ca	circa
CDK	Cyclin dependent kinase
CHAPS	3-(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio-1-propansulfat
CHCA	α-cyano-4-hydroxy-cinnamic acid
Da	Dalton
d.h.	das heißt
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotid-Triphosphat
EAM	energieabsorbierende Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
et al.	und andere
etc.	und so weiter
FCS	fötales Kälberserum
h	Stunde(n)
HaCaT	Human adult low calcium high temperature
HNSCC	head and neck squamous cell carcinoma
IB	Immunblot
IDM	Interaction Discovery Mapping
IgG	Immunglobulin G
IHC	Immunhistochemie
IP	Immunpräzipitation
KCl	Kalziumchlorid
kDa	kilo-Dalton
LSM	Laser scanning microscope
M	Molar [mol/l]
MALDI-TOF	Matrix assisted laser desorption/ionization time of flight
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mM	Mikromolar
MS	Massenspektrometrie
MW	Mittelwert
Na	Natrium
NBT	Nitroblautetrazoliumchlorid
nm	Nanometer
NSC	Non silencing control

OD	optische Dichte
OT	Objektträger
PAGE	Polyakrylamidgelelektrophorese
PBS	phosphate buffered saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
pH	pondus Hydrogenii
PMF	peptide mass fingerprint
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehung pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	real time polymerase chain reaction
s	Sekunde
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SELDI-TOF	Surface enhanced laser desorption ionization time of flight
siRNA	small interfering RNA
SPA	Sinapinsäure
Tab.	Tabelle
TBE	Tris-Borat-EDTA Puffer
TBS	tris buffered saline (Tris gepufferte Salzlösung)
TBS-T	Tris buffered saline Tween 20
TFA	Triflouressigsäure
TGF β	Transformierender Wachstumsfaktor β
u.a.	unter anderem
usw.	und so weiter
U/min	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
V	Volt
WB	Western Blot
WHO	World Health Organization
z.B.	zum Beispiel

Veröffentlichungen

Publikationen

Wehder L, Arndt S, Murzik U, Bosserhoff AK, Kob R, von Eggeling F, Melle C: Annexin A5 is involved in migration and invasion of oral carcinoma. Cell Cycle 8: 1552 – 1558, 2009

Jung MJ, Murzik U, Wehder L, Hemmerich P, Melle C: Regulation of cellular actin architecture by S100A10. Exp Cell Res 316: 1234 – 1240, 2010

Wehder L, Ernst G, Crecelius AC, Guntinas-Lichius O, Melle C, Schubert US, von Eggeling F: Depicting the spatial distribution of proteins in human tumor tissue combining SELDI and MALDI imaging and immunohistochemistry. J Histochem Cytochem 58: 929 – 937, 2010

Alexandrov T, Becker M, Deininger SO, Ernst G, Wehder L, Grasmair M, von Eggeling F, Thiele H, Maass P: Spatial segmentation of imaging mass spectrometry data with edge-preserving image denoising and clustering. J Proteome Res 9: 6535 – 6546, 2010

Delaney JT, Urbanek A, Wehder L, Perelaer J, Crecelius AC, von Eggeling F, Schubert US: Combinatorial optimization of multiple MALDI matrices on a single tissue sample using inkjet printing. ACS Comb Sci 13: 218 – 222, 2011

Poster-Präsentationen

Liane Wehder, Christian Melle, Günther Ernst, Stephanie Arndt, Anja K. Bosserhoff, Ferdinand von Eggeling: Characterisation of annexin A5 regarding localisation as well as invasive potential in tumour tissue, European Biomarker Summit and Proteomics Europe, 04.-06. September 2007, Amsterdam

Liane Wehder, Ferdinand von Eggeling, Christian Melle: Annexin A5 is involved in proliferation and invasion of oral carcinoma, Doktoranden-Symposium zur Krebsforschung, 5. Mai 2009, Dornburg

Liane Wehder, A. Crecelius, U. S. Schubert, Ferdinand von Eggeling: Analysis of the spatial distribution of proteins in human tissue with SELDI-MS and MALDI-MS, 3. Central and Eastern European Proteomic Conference, 06. – 09. Oktober 2009, Budapest

Lebenslauf

PERSÖNLICHE DATEN

Name: Liane Wehder
Geburtstag: 19.07.1983
Geburtsort: Räckelwitz/ Sachsen

Anschrift: Katharinenstraße 24
07743 Jena

Tel.: 03641-349059
0162-2716952

Familienstand: ledig, eine Tochter
Staatsangehörigkeit: deutsch

SCHULAUSBILDUNG

09/1990 – 08/1994: 2. Grundschule Kamenz

09/1994 – 08/2002: Lessinggymnasium Kamenz
Allgemeine Hochschulreife

AKADEMISCHE AUSBILDUNG

09/2002 – 01/2007: Friedrich Schiller Universität Jena
Studium der Biologie
Schwerpunkte: Mikrobiologie, Genetik und Medizinische
Mikrobiologie

02/2007 – 02/2008: Universitätsklinikum Jena, Institut für Humangenetik
Diplomarbeit mit dem Thema: „Die Rolle von Annexin V während der
Tumorinvasion“

03/2008: Erlangung des akademischen Grades „Diplom-Biologin“ (1,3)

07/2008 – 11/2012: Universitätsklinikum Jena, Institut für Humangenetik
Dissertation zum Thema: „Molekulares Imaging (MALDI-IMS)
humaner Kopf-Hals-Tumore und funktionelle Analyse pathologisch
exprimierter Proteine am Beispiel von S100A8 und Annexin A5“

04/2011 – 09/2012: Elternzeit

Eigenständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die geltende Promotionsordnung der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist und ich die vorliegende Dissertation in allen Teilen selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet habe. Alle Stellen, die dem Wortlaut oder dem Sinn entsprechend aus anderen Arbeiten übernommen wurden, sind durch Angabe der Quellen gekennzeichnet.

Bei meiner Promotion haben mich bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Erstellung des Manuskripts folgende Personen unterstützt: Prof. F. von Eggeling und Dr. G. Ernst.

Ich versichere, dass ich die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen habe und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die vorliegende Promotion wurde nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht und wurde auch nicht in dieser Form oder ähnlichen Abhandlung bei einer anderen Hochschule als Dissertation vorgelegt.

Jena, den 15.01.2013

Liane Wehder

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, die einen Beitrag zum Gelingen dieser Arbeit geleistet haben.

An erster Stelle möchte ich mich bei meinem Doktorvater **Prof. Dr. Ferdinand von Eggeling** für die Möglichkeit der Anfertigung meiner Dissertation in seiner Arbeitsgruppe Core Unit Chip Application (CUCA) am Institut für Humangenetik bedanken. Für seine immer vorhandene Diskussionsbereitschaft, die nette Arbeitsatmosphäre und für seine kooperative und fachliche Unterstützung und nicht zuletzt für die Übernahme des Erstgutachtens danke ich ihm besonders.

Ein großer Dank gilt auch **Dr. Günther Ernst** für seine freundliche Unterstützung bei der Anfertigung der histologischen Proben, seiner unermüdlichen Diskussionsbereitschaft und der Begutachtung und Sortierung des histologischen Chaos.

Besonderer Dank geht auch an **PD Dr. Christian Melle**, der immer ein offenes Ohr für mich hatte und dessen helfende Hände ich während meiner Schwangerschaft immer mal wieder in Anspruch genommen habe, um den einen oder anderen Versuch noch durchführen zu können. Außerdem danke ich ihm für die schnellen netten Mensarunden und nicht zuletzt für die Erstellung des Gutachtens dieser Arbeit.

Prof. Dr. US Schubert und **Dr. Anna Crecelius** danke ich für die immer gute Zusammenarbeit und Unterstützung bei den MALDI-IMS-Messungen.

Dr. Joseph T. Delaney danke ich für die unermüdlichen Versuche und letztendlich erfolgreiche Matrixapplikation mittels InkJet printing.

Für die Segmentierung der MALDI-IMS-Datensätze danke ich recht herzlich **Dr. Theodore Alexandrov**.

Allen aktuellen und ehemaligen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe CUCA danke ich für die freundliche und unkomplizierte Arbeitsatmosphäre, den Zusammenhalt, die gegenseitige Unterstützung und den Spaß im Labor: **Nicole, Uli, Robert, Niko, Julia, Ecki, Melanie** und **Bettina**.

Prof. Dr. Dr. Jens K. Habermann danke ich für die Erstellung des Gutachtens dieser Arbeit.

PD Dr. Claus Kerkhoff danke ich für das Überlassen des pVITRO-S100A8/A9-Plasmids.

Kristin Pietschmann danke ich für die hilfreichen Tips und Tricks bei der Formatierung der gesamten Arbeit. Sie hat Ordnung in mein Formatierungschaos gebracht und mir innerhalb von Minuten gezeigt, was ich in vielen Stunden nicht überblickt habe. Außerdem danke ich ihr für ihre Freundschaft und ihre Unterstützung in allen Lebenslagen.

Ein besonderer Dank geht an meine Eltern **Sybill**e und **Hans-Jürgen Wehder** für ihre Unterstützung, das Interesse und den unerschütterlichen Glauben an mich und meine Arbeit und den Rückhalt, auf den ich mich immer verlassen kann.

Meinem Freund **Torsten Ginter** danke ich für seine unermüdliche Unterstützung, seine aufbauenden Worte und für unsere Tochter **Thea Henrietta**. Meine kleine Familie gibt mir immer wieder Kraft und Rückhalt und lässt mich die Welt aus Kinderaugen sehen.